



**Cátia Sofia
Faria Martins**

**Estratégias para a redução de carbamato de etilo
em vinhos Madeira**



**Cátia Sofia
Faria Martins**

**Estratégias para a redução de carbamato de etilo em
vinhos Madeira**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia Alimentar, realizada sob a orientação científica da Doutora Sílvia Maria da Rocha Simões Carriço, Professora Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e do Doutor José de Sousa Câmara, Professor Auxiliar do Centro de Ciências Exactas da Universidade da Madeira

Dedico este trabalho aos meus pais e irmãos.

o júri

presidente

Prof.^a Dr.^a Ivonne Delgadillo Giraldo

professora associada com agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Prof.^a Dr.^a Maria Rosário Bronze

professora auxiliar da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa

Prof.^a Dr.^a Sílvia Maria da Rocha Simões Carriço (Orientadora)

professora auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Prof. Dr. José de Sousa Câmara (Co-orientador)

professor auxiliar do Centro de Ciências Exactas da Universidade da Madeira

agradecimentos

À minha orientadora Professora Doutora Sílvia M. Rocha, por todo o apoio e motivação, assim como por todos os conhecimentos que me transmitiu ao longo de todo o percurso académico.

Ao meu co-orientador Professor Doutor José S. Câmara pela orientação e transmissão de conhecimentos ao longo deste trabalho.

Às empresas Madeira Wine Company, S.A. e Henriques & Henriques-Vinhos, S.A., pela cedência das amostras de vinhos utilizadas neste trabalho.

Aos meus colegas de laboratório pelo companheirismo e apoio, com especial agradecimento à Rosa Perestrelo, pelo apoio incansável e amizade demonstrado.

Aos meus amigos de curso, em especial à Mariana, Sara, Fátima, Vanessa, Nuno S., Teresa, Ana, Andreia, Carlinha, Danny, Nuno V., que estiveram sempre presentes e me apoiaram.

Aos meus pais um agradecimento eterno, a todo o apoio que me proporcionaram em prol do meu sucesso pessoal e académico.

palavras-chave

Vinho Madeira, Carbamato de etilo, Microextração em fase sólida em modo espaço de cabeça, Cromatografia compreensiva bidimensional em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa por tempo de voo, Acidez volátil

resumo

O carbamato de etilo (EC) é um composto potencialmente tóxico, que foi reclassificado em 2007 como um composto provavelmente carcinogénico para humanos (grupo 2A) pela Agência Internacional de Pesquisa contra o Cancro (IARC). Este composto tem sido detectado em diversos alimentos fermentados e bebidas alcoólicas, nomeadamente em vinhos Madeira. Este trabalho visa definir estratégias conducentes à redução de EC em vinhos Madeira. Assim, foram estudados alguns factores intrínsecos (casta, tipo de vinho e processo) e extrínsecos (luz, a temperatura e o tempo de armazenamento) ao vinho que condicionam a formação de EC. Paralelamente, foi estabelecido o perfil em ácidos orgânicos voláteis com vista a explicar o aumento de acidez observada durante o envelhecimento dos vinhos Madeira. A microextração em fase sólida em modo espaço de cabeça combinada com a cromatografia compreensiva bidimensional em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa por tempo de voo (HS-SPME/GC × GC–ToFMS) foi a metodologia utilizada nestes estudos. Os vários ensaios foram realizados em vinhos modelo sintéticos e em vinhos Madeira.

Este estudo permitiu concluir que a casta e o tipo de vinho (dois factores intrinsecamente associados), o tempo e a temperatura de armazenamento influenciam a formação de EC. O estudo comparativo envolvendo 2 açúcares, glucose e sorbitol (com e sem grupo carbonilo), mostrou que a glucose catalisa a reacção de formação do EC. O aumento de temperatura que ocorre durante a estufagem e o armazenamento fornece a energia externa necessária para impulsionar a reacção de formação de EC. A ausência/presença de luz não teve grande impacto na formação de EC.

O perfil em ácidos orgânicos voláteis compreende 18 compostos, dos quais 4 foram reportados pela primeira vez em vinhos Madeira. Para os vinhos em estudo verificou-se que, a acidez total aumenta com a idade, o que poderá ser explicado com o incremento dos ácidos de cadeia curta ($C_3 - C_5$) e longa ($C_{14} - C_{18}$). Estes ácidos poderão ter origem nas reacções de hidrólise que ocorrem durante o envelhecimento e nos cascos de carvalho onde o vinho é armazenado.

Em suma, este trabalho mostra que a formação do EC é condicionada por múltiplos factores, não sendo possível indicar um único parâmetro a alterar no processo de vinificação ou armazenamento para reduzir a sua formação. Houve claramente um incremento no conhecimento sobre os factores envolvidos que permite sugerir algumas estratégias: *i)* os processos de vinificação e armazenamento deverão ser adaptados em função da casta, tipo de vinho e tempo de envelhecimento expectável, *ii)* as castas que originam vinhos doces ou meio-doces, mais susceptíveis de originar vinhos com maior teor de EC, deverão ser preferencialmente processadas a temperaturas baixas (optimizar o binómio tempo/temperatura) e *iii)* sempre que possível armazenar os vinhos a 4 °C, considerando constrangimentos financeiros, especialmente os do tipo doce e meio-doce.

keywords

Madeira Wine, Model wine, ethyl carbamate, headspace solid phase microextraction, Comprehensive multidimensional gas chromatography time-of-flight mass spectrometry, Volatile acidity

abstract

Ethyl carbamate (EC) is a potentially toxic compound, it was re-classified in 2007 as probably human carcinogen compound (Group 2A) by the International Agency for Research on Cancer (IARC). This compound has been detected on several fermented foods and alcoholic beverages, namely Madeira wine. Thus, they were studied some intrinsic (vine variety, type of wine and process) and extrinsic factors (light, temperature and storage time) to the wine that condition the formation of EC. In parallel, it was established the profile of volatile organic acids in order to explain the observed increase in acidity during the aging of Madeira wines. Headspace solid phase microextraction combined with comprehensive multidimensional gas chromatography time-of-flight mass spectrometry (HS-SPME/GC \times GC – ToFMS) was the methodology applied in these studies. The several assays were performed with synthetic model wines and Madeira wines.

This study allowed concluding that the vine variety and the type of wine (two intrinsic factors), the time and temperature of storage showed influence on the EC levels. The comparative study involving 2 sugars, glucose and sorbitol (with and without a carbonyl group) showed that glucose catalyze the reaction of EC formation. The raise of temperature that occurs during the “estufagem” and storage gives the external energy needed to promote the reaction of EC formation. An absence/presence of the light didn’t demonstrate significant effects in the formation of EC.

The profile of volatile organic acids includes 18 compounds, from which 4 were reported for the first time in Madeira wines. For the wines under this study, it was illustrated that the total acidity increases with ageing, which may be explained by the raise of short-chain ($C_3 - C_5$) and long-chain organic acids ($C_{14} - C_{18}$). These acids may have been originated by hydrolysis reactions that occur during ageing and in oak casks where the wine is stored.

In short, this work shows that the EC formation is conditioned by multiple factors; it is not possible to specify a single parameter to change in the winemaking process or storage to reduce its formation. There was clearly an increase in knowledge about the factors involved that allows us to suggest some strategies: *i)* the process of winemaking and storage should be adapted to the vine variety, type of wine and aging time expected, *ii)* vine varieties which originate sweet wines or medium-sweet, more likely to result in wines with higher content of EC, should preferably be processed at low temperatures (optimize the binomial time/temperature) and *iii)* whenever is possible the wines should be stored at 4 ° C, considering the financial constraints, especially the sweet and medium-sweet wines.

Índices

Índice Geral

Índice Geral	i
Índice de Tabelas	iii
Índice de Figuras	v
Lista de Abreviaturas.....	vii
Capítulo I. Introdução	1
1 Vinho Madeira	3
1.1 História	3
1.2 Variedades de uvas	4
1.3 Processo de vinificação.....	7
1.3.1 Estufagem	9
1.3.2 Canteiro.....	10
1.4 Classificação do vinho Madeira.....	11
1.5 Produção e marketing	12
1.6 Acidez volátil em vinhos Madeira	13
2 Contextualização mundial do consumo de bebidas alcoólicas. Risco deste consumo relacionado com a presença de carbamato de etilo.....	14
3 Formação do EC em vinhos	18
3.1 Precursores existentes nas uvas	19
3.2 Processo de vinificação – precursores e factores condicionantes.....	19
3.3 Armazenamento	21
4 Metodologias para determinação de EC em vinhos.....	22
4.1 Técnica extractiva – SPME.....	26
4.2 Técnica cromatográfica – GC × GC-ToFMS	28
5 Objectivos	30
Capítulo II. Materiais e Métodos	33

1	Materiais e Reagentes	35
2	Amostras	35
3	Metodologia global	36
3.1	Procedimento de HS-SPME	36
3.2	Análise por GC × GC-ToFMS.....	37
3.3	Processamento de dados	39
4	Aplicação da metodologia	40
4.1	Curva de calibração	40
4.2	Avaliação de diferentes parâmetros na cinética de formação de EC em vinhos Madeira e em vinhos modelo.....	41
5	Determinação da acidez total de vinho Madeira.....	42
Capítulo III. Resultados e Discussão.....		43
1	Validação da metodologia HS-SPME/GC × GC-ToFMS para a determinação de EC em vinhos Madeira	45
2	Avaliação do efeito de diferentes parâmetros na cinética de formação de EC em Vinhos Madeira e em vinhos modelo	48
2.1	Efeito das condições de armazenamento (luz, temperatura e tempo) em Vinhos Madeira.	48
2.2	Efeito do processo de estufagem em vinhos Madeira	50
2.3	Efeito do teor de glucose em vinhos modelo.....	52
2.4	Efeito do tipo de açúcar em vinhos modelo	53
3	Análise do efeito da casta, tipo de vinho e idade no teor de EC em vinhos Madeira.....	57
4	Determinação da acidez total e volátil de vinho Madeira.....	59
Capítulo IV. Conclusões.....		71
Bibliografia.....		77

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Castas de vinhos Madeira, tipos de vinho e correspondentes teores em açúcares totais.....	4
Tabela 2 - Limites de EC ($\mu\text{g/L}$) nas bebidas alcoólicas em diferentes países	17
Tabela 3 - Métodos para quantificação de EC em vinhos	23
Tabela 4 - Amostras de Vinhos Madeira fornecidas por duas empresas.....	36
Tabela 5 - Condições da SPME.....	37
Tabela 6 - Condições do GC \times GC e do ToFMS	38
Tabela 7 – Parâmetros de validação para a metodologia HS-SPME/GC \times GC-ToFMS na determinação do EC em soluções de vinho modelo seco/meio seco e doce/meio doce. 47	
Tabela 8 - Teores de EC (g/L) das amostras de Vinho Madeira	57
Tabela 9 - Acidez total (g/L) das amostras de vinho Madeira.....	60
Tabela 10 - Identificação dos ácidos orgânicos voláteis presentes nas amostras de vinhos Madeira e respectivo descritor de aroma	62
Tabela 11 – Ácidos voláteis identificados por HS-SPME/GC \times GC-ToFMS em vinhos Madeira secos (Sercial e Tinta Negra) e meio secos (Verdelho e Tinta Negra)	64
Tabela 12 - Ácidos voláteis identificados por HS-SPME/GC \times GC-ToFMS em vinhos Madeira doces (Tinta Negra e Malvasia) e meio doces (Bual)	65

Índice de Figuras

Figura 1 - Vinho Madeira	3
Figura 2 - Distribuição do cultivo das castas utilizadas na produção do vinho Madeira ..	5
Figura 3 - Sistema em pérgola	5
Figura 4 - Casta Malvasia.....	6
Figura 5 - Casta Bual	6
Figura 6 - Casta Verdelho.....	6
Figura 7 - Casta Sercial	7
Figura 8 - Casta Tinta Negra	7
Figura 9 - Processo de vinificação do vinho Madeira	8
Figura 10 - Estufas à escala piloto existentes na Universidade da Madeira	9
Figura 11 – Canteiros utilizados para envelhecimento dos vinhos Madeira	10
Figura 12 - Exemplo de rótulo de uma garrafa de Vinho Madeira.....	11
Figura 13 – Comercialização de vinho Madeira (quantidade em litros) nos últimos 5 anos	12
Figura 14 – Preferência do consumo de bebidas alcoólicas em Portugal (em % de álcool puro), em 2005	15
Figura 15 - Produção de Vinho em Portugal (Milhares de toneladas)	15
Figura 16 - Consumo de bebidas alcoólicas <i>per capita</i> em Portugal, entre 1961-2005 ..	15
Figura 17 - Níveis de EC em diversos alimentos, adaptação de FSANZ, 2007	16
Figura 18 - Possíveis vias de formação do EC em produtos processados	20
Figura 19 – Formação de EC (meio ácido) pela reacção química entre a ureia e etanol	20
Figura 20 - Efeito do tempo na formação de EC, variando as concentrações de ureia e a diferentes temperaturas (A - 13 °C, B - 19 °C e C - 24 °C)	21
Figura 21 - Modo de extracção directa (DI-SPME, A) e modo de extracção em espaço de cabeça (HS-SPME, B)	27
Figura 22 - Procedimento de extracção por HS-SPME	27
Figura 23 - Procedimento de desorção de HS-SPME num cromatógrafo	28
Figura 24 – Diagrama conceptual do um sistema GC × GC.	29
Figura 25 - Esquema representativo da metodologia HS-SPME/GC × GC–ToFMS.	30
Figura 26 - Tópicos de estudo da Tese de Mestrado	31
Figura 27 - Estrutura química do carbamato de etilo (EC).....	35

Figura 28 - Esquema representativo dos diferentes estudos efectuados para análise da cinética de formação de EC	41
Figura 29 - Diagrama de contornos do GC × GC (A) e respectivo cromatograma 1D em modo de extracção de ião m/z 62 (B), obtido com uma amostra de Vinho Bual (10 Anos)	45
Figura 30 - Curva de calibração para vinhos modelos doces	46
Figura 31 - Curva de calibração para vinhos modelos secos.....	46
Figura 32 - Cinética de formação do carbamato de etilo (EC) em diferentes condições de armazenamento de um vinho da casta Tinta Negra do tipo doce (2009): temperatura de 4°C, ambiente e 40°C; presença ou ausência de luz	49
Figura 33 - Teores de carbamato de etilo (EC) de vinhos Madeira da casta Tinta Negra do tipo seco e doce, antes e após o processo de estufagem	51
Figura 34 - Cinética de formação do carbamato de etilo (EC) em diferentes condições de armazenamento de vinhos modelo (doce e seco)	52
Figura 35 - Representação da estrutura da glucose (A) e do sorbitol (B)	53
Figura 36 - Teores de carbamato de etilo (EC) em vinhos modelo	54
Figura 37 - Mecanismo de reacção entre a glucose e a ureia, em meio ácido.....	54
Figura 38 - Mecanismos de reacção (A e B) entre o sorbitol e a ureia, em meio ácido..	55
Figura 39 - Acidez total (g/L) das amostras de vinho Madeira em função da idade	59
Figura 40 - Diagrama de contornos em modo de iões totais (TIC) do GC × GC, obtido com uma amostra de vinho Sercial (15 anos), onde se encontram o perfil da acidez volátil, evidenciando os ácidos presentes	63
Figura 41 - Áreas cromatográficas (u.a.) dos diferentes ácidos orgânicos para as amostras de vinho da casta Sercial	67
Figura 42 – Idade observada dos vinhos versus a idade estimada pelo modelo de calibração obtido por PLS	68
Figura 43 - Loadings obtidos pelo modelo do PLS, correlacionando a idade dos vinhos com os teores dos ácidos orgânicos voláteis	69

Lista de Abreviaturas

Abreviatura	Denominação em português	Denominação em inglês
BC	Carbamato de butilo	Butyl carbamate
CAR-PDMS	Carboxeno-polidimetil-siloxano	Carboxen-polydimethylsiloxane
CW-DVB	Carbowax-divinilbenzeno	Carbowax-divinylbenzene
DE-SPME	Extracção directa-SPME	Direct extraction-SPME
DVB-CAR-PDMS	Divinilbenzeno-carboxeno-polidimetilsiloxano	Divinylbenzene-carboxen-poly(dimethylsiloxane)
EC	Carbamato de etilo	Ethyl carbamate
ECD	Detector de captura de electrões	Electron capture detector
EPA US	Agência de Protecção Ambiental dos Estados Unidos	United States Environmental Protection Agency
FAO	Organização para a Alimentação e Agricultura das Nações Unidas	Food and Agriculture Organization of the United Nations
FID	Detector de ionização à chama	Flame ionization detector
FLD	Detector de fluorescência	Fluorescence detection
FSANZ	Normas alimentares da Australia e Nova Zelândia	Food Standards Australia New Zealand
GC × GC-ToFMS	Cromatografia compreensiva bidimensional em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa por tempo de voo	Comprehensive two-dimensional gas chromatography with time-of-flight mass spectrometry
GC-MS	Cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massa	Gas chromatography-mass spectrometry
GC-MS/MS	Cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massa tandem	Gas chromatography-tandem mass spectrometry
GC-O	Cromatografia em fase gasosa acoplada a olfactometria	Gas chromatography-olfactometry

Lista de Abreviaturas (cont.)

Abreviatura	Denominação em português	Denominação em inglês
HECD	Detector de condutividade electrolítico de Hall	Hall Electrolytic Conductivity Detector
HPLC	Cromatografia líquida de elevada eficiência	High-performan liquid chromatography
HS-SPME	Espaço-cabeça-SPME	Headspace-SPME
IARC	Agência Internacional para a Pesquisa do Cancro, da Organização Mundial da Saúde	World Health Organization's International Agency for Research on Cancer
IVBAM	Instituto do Vinho, do Bordado e do Artesanato da Madeira	Institute for Wine, Embroidery and Handicrafts of Madeira
JECFA	Comité de Peritos em Aditivos Alimentares	Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives
LLE	Extracção líquido-líquido	Liquid-liquid extraction
LOD	Limite de detecção	Detection limit
LOQ	Limite de quantificação	Quantification limit
LPS	Limiar de percepção sensorial	Sensorial perception limit
m/z	Razão massa carga	Mass to charge ratio
MDGC	Cromatografia em fase gasosa multidimensional	Multidimensional Gas Chromatography
min	Minutos	Minutes
NCD	Detector de quimioluminescência de azoto	Nitrogen Chemiluminescence Detector
NPD	Detector de azoto-fósforo	Nitrogen phosphorus detector
OIV	Organização Internacional do Vinho e da Vinha	Office International de la Vigne et du Vin
OMS/WHO	Organização Mundial de Saúde	World Health Organization
p.e.	Por exemplo	For example
PA	Poliacrilato	Polyacrylate
PC	Carbamato de propilo	Propyl carbamate

Lista de Abreviaturas (cont.)

Abreviatura	Denominação em português	Denominação em inglês
PDMS	Polidimetilsiloxano	Polydimethylsiloxane
PDMS-DVB	Polidimetilsiloxano-divinilbenzeno	Polydimethylsiloxane-divinylbenzene
PEG	Carbowax-poli(etil)enoglicol	Carbowax-poly(ethylene glycol)
PLS	Regressão por Mínimos Quadrados Parciais	Partial Least Squares regression
RI	Índices de retenção/Kovats	Retention index
RSD	Desvio-padrão relativo	Relative standard deviation
SIM	Monitorização do ião selectivo	Selective Ion Monitoring
SPE	Extracção em fase sólida	Solid Phase Extraction
SPME	Microextracção em fase sólida	Solid-Phase Microextraction
u.a.	Unidades arbitrárias	Arbitrary units
TIC	Cromatograma de iões totais	Total ion current chromatogram
t_R	Tempo de retenção	Retention time

Capítulo I. Introdução

Capítulo I - Introdução

1 Vinho Madeira

1.1 História

O vinho Madeira (Figura 1) é um vinho fortificado, com características peculiares que advêm do seu processo singular de vinificação e de envelhecimento. É um vinho com teor alcoólico entre 17 e 22 % (v/v), sendo produzido na Ilha da Madeira.



Figura 1 - Vinho Madeira [1]

A Ilha da Madeira tem uma longa história na produção de vinho desde a Idade Média, quando a Madeira era um porto de paragem para os navios que seguiam para o Novo Mundo ou as Índias Orientais. Dada à qualidade do vinho Madeira, 25 anos após a colonização da Ilha da Madeira (1425), este começou a ser comercializado e, posteriormente exportado. As áreas de cultivo foram aumentando, levando a maiores taxas de exportação do vinho Madeira, permitindo que este se tornasse mundialmente conhecido.

A procura excessiva deste vinho no século XVIII teve consequências negativas: os vinhos de boa qualidade eram misturados com vinhos de menor qualidade; e entraram no mercado falsos vinhos Madeira. Nesse mesmo século introduziram-se duas novas técnicas para o desenvolvimento do carácter do vinho: a fortificação (adição de álcool vínico (96 % v/v) gradual (EU No. 3111, 1993)) e a estufagem. A fortificação foi introduzida para prevenir o vinho da deterioração microbológica. O aquecimento proporcionado ao vinho Madeira durante a sua exportação (longas viagens marítimas), especialmente na passagem por regiões tropicais, contribuía positivamente para o *flavour* dos vinhos. Dada esta evidência, tentou-se produzir o mesmo efeito de modo artificial pelo processo designado de estufagem. No século XVIII surgiram vários engenhos, uns operavam por aquecimento directo, outros por circulação de ar quente e posteriormente a utilização de vapor de água

Capítulo I - Introdução

que circulava em serpentinas de cobre que mergulhavam no vinho. Actualmente a estufagem decorre em estufas de aço inox. A estufagem e a fortificação tornaram-se, assim, uma prática comum de estabilização dos vinhos durante as longas viagens para mercados mais distantes [1-4].

1.2 Variedades de uvas

O vinho Madeira é essencialmente produzido a partir de 5 variedades de castas *Vitis vinifera* L., nomeadamente Malvasia, Verdelho, Bual e Sercial (variedades de uva branca, e consideradas castas nobres); e a Tinta Negra (variedade de uva tinta) (Tabela 1). A área de cultivo das plantações da casta Tinta Negra representa cerca de 90 % do total da área cultivada. No entanto, existem outras castas recomendadas (p.e. Bastardo, Terrantez, Malvasia Roxa) e autorizadas (p.e. Listrão) [2].

Tabela 1 - Castas de vinhos Madeira, tipos de vinho e correspondentes teores em açúcares totais

Tipo de Casta	Tipo de vinho	Teor em açúcares totais (g/L) ¹
Malvasia	Doce	96,1-150
Bual	Meio Doce	80,4-96,1
Verdelho	Meio Seco	64,8-80,4
Sercial	Seco	49,1-64,8
Tinta Negra	Todos os tipos	49,1-150

A Ilha da Madeira caracteriza-se pelo solo de natureza vulcânica, uma orografia acentuada e uma vegetação abundante devido à humidade e suavidade do clima. É principalmente nas encostas ensolaradas do lado sul da Ilha (Figura 2), especialmente em socalcos denominados de “*poios*”, onde as principais variedades são cultivadas. Todos estes factores influenciam as propriedades físico-químicas e organolépticas dos vinhos, conferindo-lhes, assim, características únicas e singulares.

As vinhas estão dispersas pela ilha da Madeira (Figura 2), assim como no Porto Santo. Da área total da ilha da Madeira (cerca de 732 km²), cerca de 4 km² são utilizados para produzir Vinho Licoroso de Qualidade Produzido em Região Determinada (VLQPRD Madeira). [2, 5]

¹ Expresso em g/L de glucose

Capítulo I - Introdução

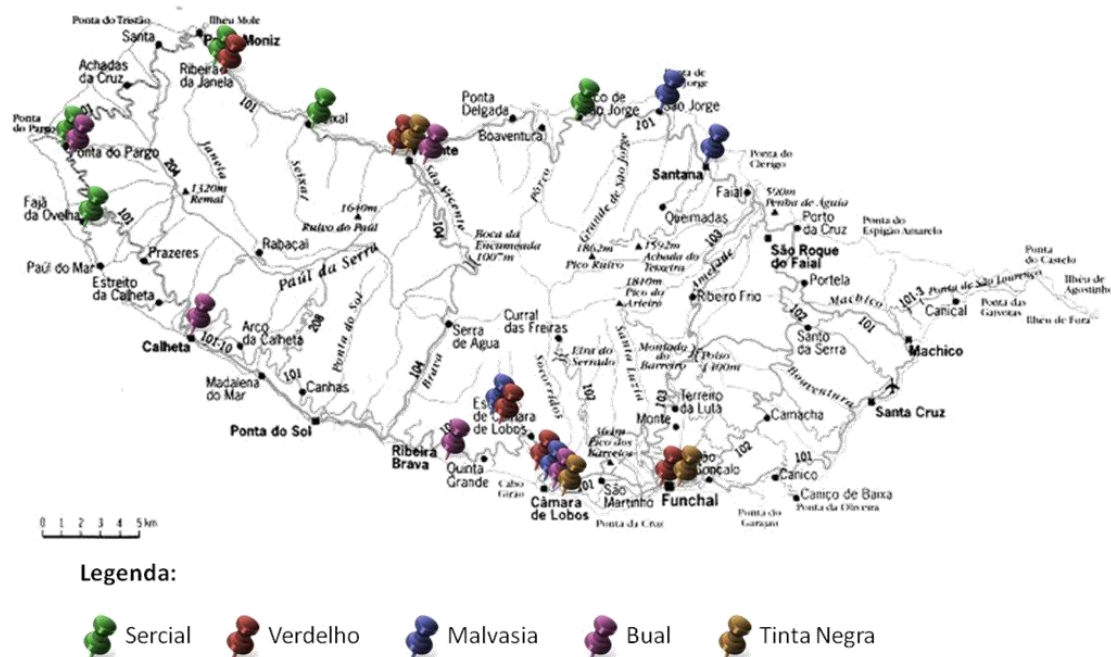


Figura 2 - Distribuição do cultivo das castas utilizadas na produção do vinho Madeira [6]

Existem dois sistemas de cultivo: a “latada” e a espaldeira. O sistema de condução das vinhas vulgarmente utilizado é a “latada” (pérgola) (Figura 3), onde as vinhas são conduzidas horizontalmente sobre arames e suspensas do chão por estacas. Este tipo de prática faz com que as folhas formem uma espécie de telhado, que protege as uvas de ventos fortes, e por vezes, de mudanças drásticas de temperatura e da exposição solar directa. Na segunda metade do século XX, introduziu-se o sistema de condução em espaldeira (sistema de condução da vinha na vertical), mas este apenas pode ser utilizado em terrenos com o declive pouco acentuado [2].



Figura 3 - Sistema em pérgola [7]

De seguida encontra-se uma descrição das castas utilizadas neste trabalho experimental.

Capítulo I - Introdução

Malvasia

A casta Malvasia, igualmente conhecida por Malvasia Cândida, é uma casta branca, sendo originária de Creta, Grécia, produzindo um vinho doce (96,1-150 g/L teor de açúcares totais). Esta casta é caracterizada por pequenos cachos elípticos, bagos grandes e oblongos (Figura 4). Dado o seu aroma e doçura, as uvas desta variedade são também usadas como uva de mesa. As plantações mais representativas situam-se em São Jorge e Santana, na costa norte, e em Câmara de Lobos e Estreito de Câmara de Lobos, na costa sul da Ilha (ver mapa na Figura 2) [2, 3, 8].



Figura 4 - Casta Malvasia

Bual

Bual é uma casta branca, que leva à produção de vinhos meio doces (80,4-96,1 g/L teor de açúcares totais). Actualmente o seu nome está ligado com o Bual da Madeira, também conhecido por Bual Cachudo. Esta casta é cultivada no norte da Ilha junto a São Vicente e Ponta do Pargo, e a Sul no Campanário, Calheta e Câmara de Lobos (ver mapa na Figura 2). Caracteriza-se por cachos grandes, pesados e com película resistente (Figura 5). Tal como as uvas Malvasia, estas uvas também são consumidas como uvas de mesa, devido ao seu sabor doce [2, 3, 8].



Figura 5 - Casta Bual

Verdelho

Verdelho é uma casta branca, que origina um vinho meio seco (64,8-80,4 g/L teor de açúcares totais). Os cachos de uvas são maiores que as Sercial; têm cerca de 20 cm de comprimento, com bagos oblongos e comprimidos lateralmente, sendo a película das uvas resistente (Figura 6). Podem ser consumidas directamente pelos consumidores como uvas de mesa. É possível encontrar as plantações desta casta no lado sul da Ilha desde o oeste do Funchal

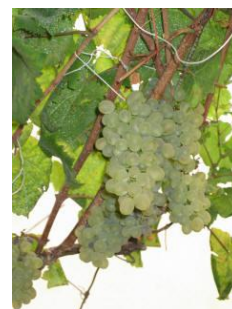


Figura 6 - Casta Verdelho

Capítulo I - Introdução

até ao Estreito de Câmara de Lobos. No lado norte, esta é cultivada em modo pérgola na Ribeira da Janela e São Vicente (ver mapa na Figura 2) [2, 3, 8].

Sercial

As vinhas desta casta encontram-se situadas no Seixal, Ribeira da Janela, Jardim da Serra, Fajã da ovelha, Ponta do Pargo e Arco S. Jorge, todas no litoral norte da Ilha (ver mapa na Figura 2). As uvas são muito compactas; apresentando-se em cachos pequenos em forma de pinha e bagos compactos; os cachos têm cerca de 18 cm de comprimento e apresentam uma tonalidade amarelo esverdeada (Figura 7). É uma casta também conhecida por “Esgana Cão”, uma vez que tem uma elevada adstringência e acidez. Os vinhos produzidos por este tipo de casta são secos (49,1-64,8 g/L teor de açúcares totais) [2, 3, 8].



Figura 7 - Casta Sercial

Tinta Negra

Tinta Negra é uma casta tinta. É um tipo de casta muito versátil e vigorosa, possui bagos médios a pequenos, em que a película das uvas é muito fina (Figura 8). Representa 90 % do cultivo total de castas de vinho Madeira, sendo produzidos vinhos secos, meio secos, doces e meio doces. As suas vinhas cultivam-se nos arredores do Funchal, São Vicente e Câmara de Lobos (ver mapa na Figura 2) [2, 3, 8].



Figura 8 - Casta Tinta Negra

1.3 Processo de vinificação

O processo de vinificação e envelhecimento do vinho Madeira encontra-se esquematizado na Figura 9.

Capítulo I - Introdução

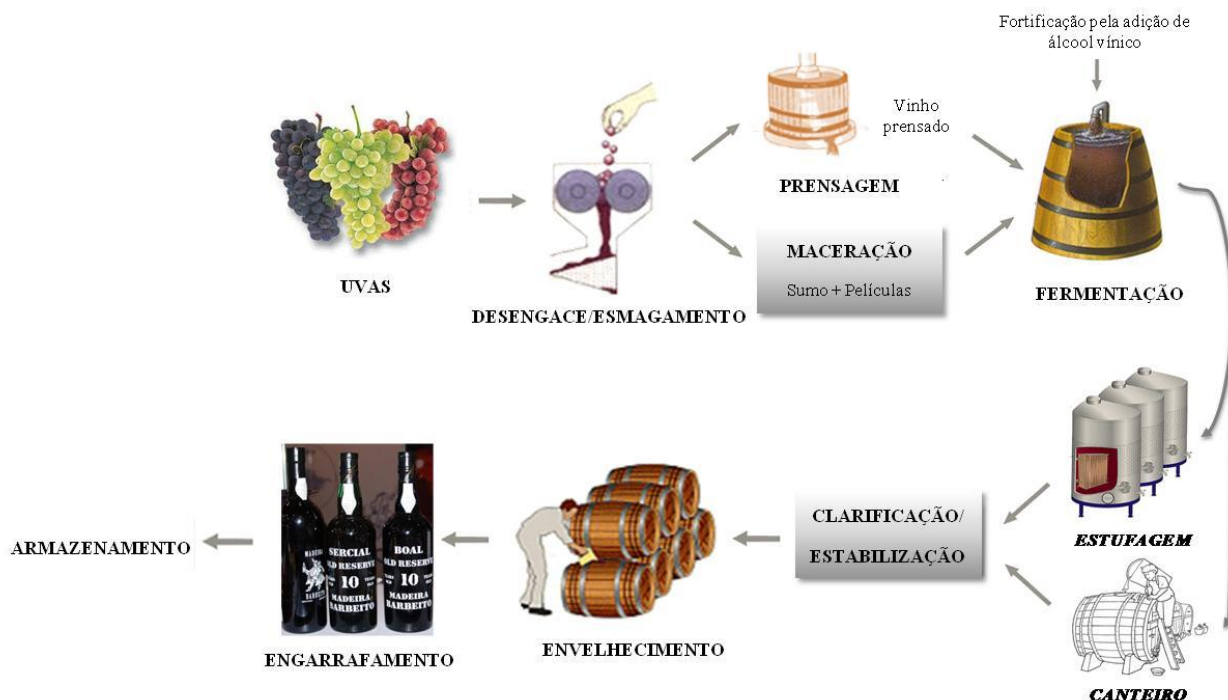


Figura 9 - Processo de vinificação do vinho Madeira [2]

Todo o processo de vinificação inicia-se pela colheita das uvas – vindimas. As vindimas decorrem normalmente entre meados de Agosto e de Outubro de uma forma manual dada a orografia acidentada, o que dificulta bastante o processo. As uvas são recolhidas em pequenos contentores (20-30 Kg), posteriormente colocadas em camiões e, transportadas para as adegas onde é feita uma avaliação do seu estado fitossanitário. Após pesagem e estabelecimento do seu potencial alcoólico, é decidido que tipo de vinho será produzido por essas uvas. A partir daqui inicia-se o processo de desengace e prensagem para a obtenção do mosto.

A fermentação é interrompida pela adição de álcool vínico (96 % v/v) – fortificação, de acordo com o tipo de vinho pretendido para o vinho. Para a casta Malvasia (doce), a fortificação ocorre dois dias após o início da fermentação, de forma a reter a quantidade ideal de açúcar (110 g/L de açúcar residual). No caso da casta Bual (meio doce), a fortificação é feita a partir do terceiro dia, depois de aproximadamente metade do açúcar ter sido convertido em etanol (65 g/L de açúcar residual), enquanto para a casta Verdelho (meio seco) ocorre passados quatro dias de fermentação (90 g/L de açúcar residual). Para a casta Sercial (seco), a fortificação ocorre no final da fermentação, obtendo-se um vinho seco com 25 g/L de açúcar residual. Como para a casta Tinta Negra é possível obter-se vários graus de doçura, o tempo de fermentação será de acordo com esse

Capítulo I - Introdução

teor pretendido. Após este processo, os vinhos apresentam um teor de etanol entre os 17-22 % (v/v) [2-5].

Uma vez fortificados, os vinhos podem ser sujeitos a um de dois processos distintos: estufagem ou canteiro.

1.3.1 Estufagem

Os vinhos novos fortificados são transferidos para estufas (Figura 10). Estas consistem em grandes contentores de aço inoxidável, com um sistema de serpentina onde circula água quente. O vinho permanece, pelo menos, três meses no interior destas estufas, a uma temperatura entre 45-50 °C. Posteriormente, o vinho é arrefecido, pelo menos, 90 dias à temperatura ambiente. Após esse período, os vinhos podem continuar nas cubas de inox ou serem transferidos para cascos de madeira, até que o vinho se encontre pronto para engarrafado e comercializado (pode ser entre três e quinze anos) [2-5]. Este processo de aquecimento durante a maturação do vinho permite acelerar o processo de envelhecimento do vinho.



Figura 10 - Estufas à escala piloto existentes na Universidade da Madeira [9]

Durante a estufagem ocorrem diversas reacções químicas que contribuem para o aperfeiçoamento das propriedades sensoriais, contudo ocorre igualmente a formação de contaminantes (p.e. carbamato de etilo). No que se refere às propriedades sensoriais, ocorre uma perda de aromas varietais e fermentativos, responsáveis pelos odores frutados e florais característicos dos vinhos novos; e adquirem uma maior complexidade aromática com odores característicos a chá, a chocolate, a café, a frutos secos e a especiarias, que sugerem a presença de compostos voláteis resultantes da reacção Maillard. [10]

Capítulo I - Introdução

1.3.2 Canteiro

Relativamente aos vinhos de qualidade superior, incluindo os *Vintage*, são envelhecidos em cascos de madeira de grande capacidade, sendo estes colocados sob suportes de madeira – canteiros (Figura 11), nomeadamente em locais aquecidos pelo sol (usualmente nos pisos mais elevados das caves), com temperaturas que podem atingir os 30-35 °C e níveis de humidade elevados (70-75 %). Trata-se de um envelhecimento oxidativo de, pelo menos, 2 anos conferindo-lhes uma enorme complexidade de aromas. Uma vez que o aquecimento é bastante mais lento do que na estufagem, os vinhos de canteiro necessitam de mais tempo para o seu desenvolvimento, podendo permanecer até 100 anos ou mais. Regra geral vinhos que são estufados durante 3 meses adquirem as características organolépticas de vinhos que são envelhecidos durante 6 anos em canteiro. Durante esse período, ocorre concentração e oxidação dos compostos; e o teor de álcool pode aumentar, podendo atingir os 25 % (v/v). Por fim, o vinho é engarrafado e repousa durante dois anos antes de ser comercializado; no caso particular dos *Vintage*, estes vinhos têm de permanecer em cascos por um período mínimo de 20 anos, e depois estagiam 2 anos em garrafa. Caso o vinho não atinja os requisitos para um vinho *Vintage*, este é utilizado para o loteamento [2-5].



Figura 11 – Canteiros utilizados para envelhecimento dos vinhos Madeira [3]

O vinho Madeira após ter sido sujeito ao processo de estufagem ou de canteiro, é envelhecido predominantemente em cascos de carvalho. Originalmente os cascos de carvalho tinham uma função prática em relação ao vinho, uma vez que serviam de recipiente para armazenamento e/ou transporte do mesmo. Mas rapidamente os vinicultores descobriram que o armazenamento em madeira não só apresentava a vantagem de clarificar e estabilizar o vinho, como podia melhorar o seu carácter organoléptico,

Capítulo I - Introdução

acrescentando sabores complexos aos vinhos brancos e maior longevidade e estrutura aos tintos. Estes factores eram influenciados pela duração e modo de contacto com o carvalho, pela idade do recipiente e pelo tipo de carvalho [11]. Para além das reacções de oxidação que se desenvolvem durante o envelhecimento nos cascos, também podem ocorrer reacções de redução durante o envelhecimento em garrafas [12]. O “bouquet” (aromas provenientes do envelhecimento) depende da temperatura, do tempo de armazenamento e das diversas reacções químicas que ocorrem durante esse período.

1.4 Classificação do vinho Madeira

No mercado é possível encontrar-se várias categorias de vinhos Madeira de acordo com a idade dos mesmos: 3 (*Finest*), 5 (*Reserve*), 10 (*Old Reserve*), 15 (*Extra Reserve*), e mais do que 20 anos (*Vintage*). Os vinhos de 3, 5, 10 e 15 anos resultam, normalmente, de mistura, ou seja, *blended*, enquanto os vinhos *Vintage* são produzidos exclusivamente com um tipo de casta e de uma só colheita.

De notar, que antes de qualquer um dos tipos de Madeira ser engarrafado, os vinhos podem ser loteados, conferindo-lhes as características organolépticas e a garantia de qualidade necessárias para a sua comercialização. Nos rótulos dos vinhos misturados ou *blended* encontra-se a indicação da idade destes que corresponde à idade aparente dos vinhos utilizados. [2-5]. Nos rótulos de garrafas de vinho Madeira (exemplo na Figura 12) é possível encontrar-se o nome da casta a partir do qual o vinho foi feito (essa casta corresponde a 85 % da composição do vinho, sendo os restantes 15 % pertencentes a outros tipos de casta, normalmente a Tinta Negra), assim como o tipo de vinho (está intimamente ligado à extensão da fermentação) (Tabela 1).

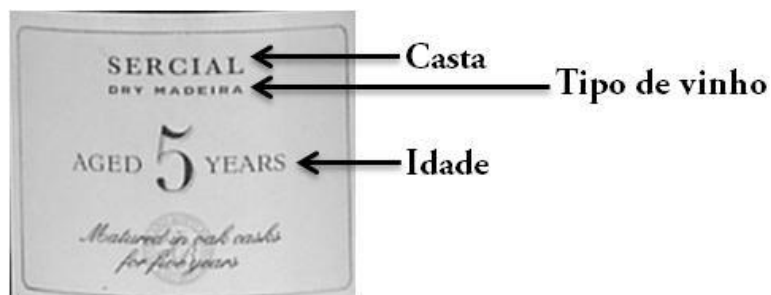


Figura 12 - Exemplo de rótulo de uma garrafa de Vinho Madeira [13]

Capítulo I - Introdução

1.5 Produção e marketing

A produção total de uvas *Vitis vinifera* L. em 2010 na Região Autónoma da Madeira foi de 3730 toneladas, que corresponde a uma produção de 3,07 milhões de litros de vinho Madeira. Pela Figura 13 é possível verificar-se o volume de comercialização de vinhos Madeira, que se tem mantido estável nos últimos 5 anos [2, 5].

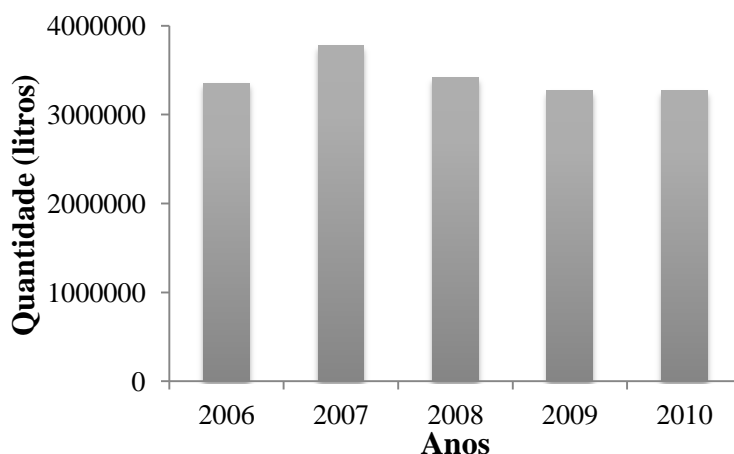


Figura 13 – Comercialização de vinho Madeira (quantidade em litros) nos últimos 5 anos [2, 5]

Segundo o *Instituto do Vinho, do Bordado e do Artesanato da Madeira* (IVBAM – entidade responsável pela fiscalização, certificação e controlo do vinho Madeira), a quota de mercado do vinho Madeira da União Europeia é de 69 %, sendo os principais países importadores deste produto: a França, a Alemanha e o Reino Unido. Já a nível Nacional, a quota é de 14 %, sendo que os principais consumidores se encontram na Ilha, uma vez que os turistas são impulsionados a comprar o produto aquando das visitas ao local. Fora da União Europeia, os principais países importadores são o Japão e os Estados Unidos da América. Verifica-se que os vinhos mais comercializados, em função do tipo de vinho, são os vinhos doces (Malvasia) e meio secos (Verdelho) [2, 5].

Como estratégia de marketing e posterior comercialização do produto, actualmente os viticultores e as empresas ligadas à produção e comercialização do vinho Madeira encontram-se muito empenhados na constante melhoria da qualidade do vinho, dada a exigência dos consumidores, cada vez mais atentos e informados. Desde a plantação das vinhas, o engarrafamento do vinho e até este estar disponível para o consumidor (p.e. proibição de venda de vinho Madeira a granel), nada é deixado ao acaso para que o prestígio e a fama de um dos melhores vinhos do Mundo sejam preservados [2].

Capítulo I - Introdução

1.6 Acidez volátil em vinhos Madeira

O *flavour* é uma das características distintivas dos vinhos, sendo uma impressão sensorial geral tanto do aroma (sentido pelo nariz e boca), como de certos compostos químicos que podem incorporar aspectos mensuráveis, tais como acidez, doçura, adstringência, amargor, entre outros. O *flavour* refere-se aos efeitos de odor e sabor; já o aroma é associado apenas ao odor, compostos voláteis [14].

Nos vinhos e nos mostos, a composição ácida estabelece alguns dos principais factores condicionantes do equilíbrio físico-químico, que caracterizam alguns processos evolutivos do meio. Esta composição ácida confere uma elevada estabilidade microbiológica e contribui para as propriedades organolépticas de um vinho.

Os ácidos presentes nos vinhos são provenientes das uvas, essencialmente da polpa (e.g. ácido tartárico, ácido málico), outros resultam da actividade da levedura durante o processo fermentativo (e.g. acético, succínico) e outros, ainda, surgem de reacções químicas e operações tecnológicas que ocorrem durante a evolução dos mostos e dos vinhos.

Os ácidos orgânicos voláteis com número par de átomos de carbono: butanóico, hexanóico, octanóico e decanóico, provêm do metabolismo dos lípidos. Os ácidos propanóico, 2-metilpropanóico, 2-metilbutanóico e 3-metilbutanóico, formam-se a partir dos α -cetoácidos [15]. Estes ácidos orgânicos voláteis encontram-se normalmente nos vinhos em concentrações inferiores ao seu limiar de percepção sensorial (LPS). No entanto, quando as concentrações são superiores ao seu LPS, estes contribuem com odores a vinagre, queijo, manteiga, ranço, entre outros, que são considerados *off-flavours* [10, 16]. A formação dos ácidos orgânicos voláteis depende das condições em que decorre a fermentação. Os factores favoráveis à sua produção são a anaerobiose, baixas temperaturas de fermentação e a clarificação dos mostos.

O ácido acético é quantitativamente o mais abundante (90% da acidez volátil dos vinhos), o qual se forma essencialmente durante o processo fermentativo. A sua formação depende das condições de fermentação, da presença de oxigénio, da composição dos mostos, da espécie e da estirpe de levedura utilizada [15].

Diversos estudos associados à caracterização da composição volátil dos vinhos Madeira reportaram a presença de ácidos orgânicos voláteis, tais como ácido acético, hexanóico, octanóico, entre outros [10, 17-22]. Câmara *et al.* [20], reportou pela primeira

Capítulo I - Introdução

vez a evolução desta família química durante o envelhecimento dos vinhos Madeira produzidos a partir da casta Bual, Malvasia, Sercial e Verdelho. No decurso do envelhecimento, os ácidos orgânicos voláteis apresentam evoluções distintas, ou seja, os ácidos de cadeia curta (p.e. ácido propanóico, butanóico, 3-metilbutanóico) aumentam durante o envelhecimento, enquanto os ácidos orgânicos voláteis de cadeia média/longa (p.e. ácido hexanóico, octanóico, decanóico) decrescem.

2 Contextualização mundial do consumo de bebidas alcoólicas. Risco deste consumo relacionado com a presença de carbamato de etilo

O consumo de bebidas alcoólicas é uma prática comum na maioria das civilizações actuais. Tudo começou, nos tempos pré-históricos, onde se deu o primeiro contacto do Homem com este tipo de bebidas, tendo, de alguma forma, influenciado os padrões culturais e/ou sociais dos vários países, inclusive Portugal. Hoje em dia, os portugueses associam o consumo do álcool a actos sociais e festivos.

De acordo com os dados da *Organização Mundial de Saúde* (OMS), estima-se que no Mundo, em 2002, mais de 1,9 biliões de adultos (idade igual ou superior a 15 anos) consumiram bebidas alcoólicas de forma regular, com um consumo médio diário de 13 g de etanol (cerca de 1 bebida) [23].

Portugal, a par de alguns países do Mediterrâneo como a Espanha, a França, a Itália e a Grécia, foi e continua a ser produtor de vinho de qualidade, promovendo o seu consumo moderado como parte integrante da dieta mediterrânica. A notoriedade de Portugal, neste sector, dá-se a nível da exportação: segundo a *Organização para a Alimentação e Agricultura das Nações Unidas* (FAO), em 2008, Portugal encontrava-se em 8º lugar a nível mundial; e ao próprio consumo da população: em 2005, segundo a OMS o vinho foi a bebida alcoólica mais consumida pelos portugueses (Figura 14) [24, 25].

Capítulo I - Introdução

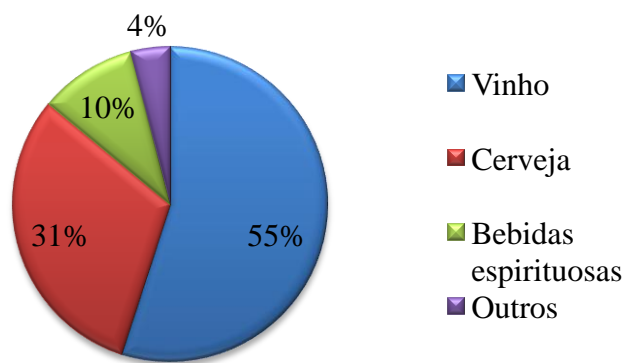


Figura 14 – Preferência do consumo de bebidas alcoólicas em Portugal (em % de álcool puro), em 2005 [24]

Na Figura 15 verifica-se que a produção de vinho em Portugal diminuiu nas últimas décadas do Século XX, tendo-se mantido estável na primeira década do Século XXI. Este acontecimento acompanha a tendência de consumo de vinho, quer em Portugal (Figura 16), quer a nível europeu, onde se registou uma diminuição do consumo de bebidas até à década de 90, havendo uma estabilização na última década.

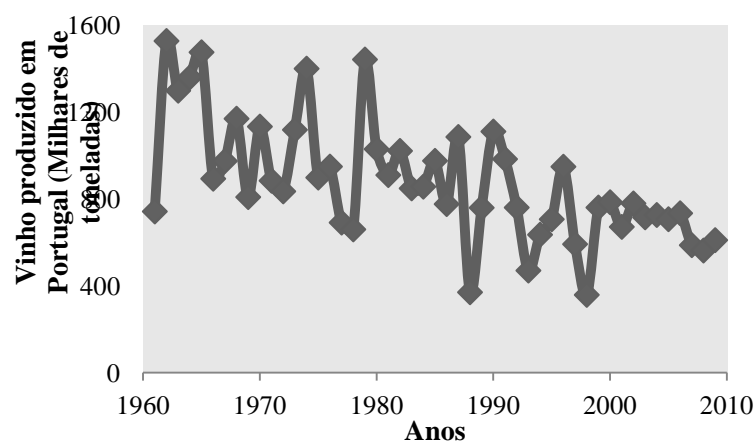


Figura 15 - Produção de Vinho em Portugal (Milhares de toneladas) [26]

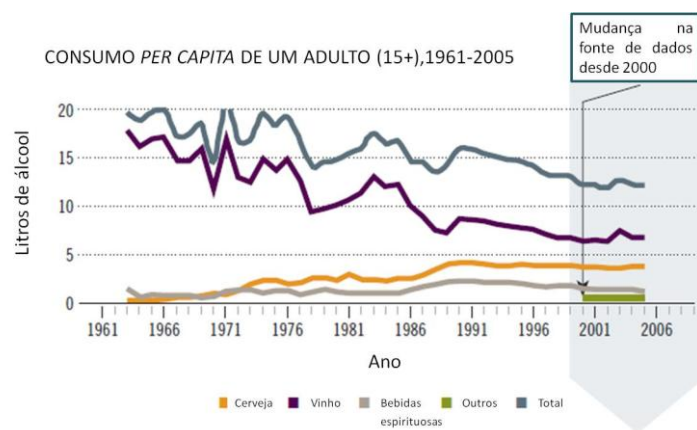


Figura 16 - Consumo de bebidas alcoólicas *per capita* em Portugal, entre 1961-2005 [24]

Capítulo I - Introdução

Sabe-se que o consumo moderado de vinho com teor alcoólico entre 10 e 13 % (v/v) (1 ou 2 copos por dia, para mulheres ou homens respectivamente) tem benefícios para a saúde humana, p.e. redução do risco de doença cardíaca, mas também diminuição da progressão de doenças neurológicas degenerativas (p.e. Alzheimer ou Parkinson), devido a compostos fenólicos, antioxidantes, etc. [27]. No entanto, o consumo excessivo proporciona um desequilíbrio quer físico, mental ou social; há maior probabilidade de ocorrência de acidentes domésticos, laborais e de condução, violência, incapacidade prematura e até a morte [27, 28]. Por esta razão, a OMS identificou que o consumo de álcool encontra-se no TOP 10 mundial dos riscos de doenças [23, 24].

A ingestão de algumas bebidas alcoólicas pode promover outro tipo de preocupações uma vez que a presença de alguns compostos pode ser prejudicial para o ser humano, p.e. sulfitos, carbamato de etilo (EC). O EC encontra-se presente numa diversidade de alimentos e bebidas alcoólicas, com maior representação neste último grupo, demonstrado pelo estudo da *Food Standards Australia New Zealand* (FSANZ) [29], em 2007/2008. Neste estudo monitorizou-se a segurança da cadeia alimentar australiana, estudando, nomeadamente, os níveis de EC, numa diversidade de alimentos e bebidas. Foi concluído que 28 % das amostras que continham EC eram bebidas alcoólicas, tais como cerveja, vinho de mesa, vinhos fortificados, entre outros (Figura 17). Este estudo comprova as preocupações actuais relacionadas com a Saúde Pública aquando da ingestão de alimentos com este composto, em particular por parte da indústria alimentar que tem tentado reduzir os níveis de EC.

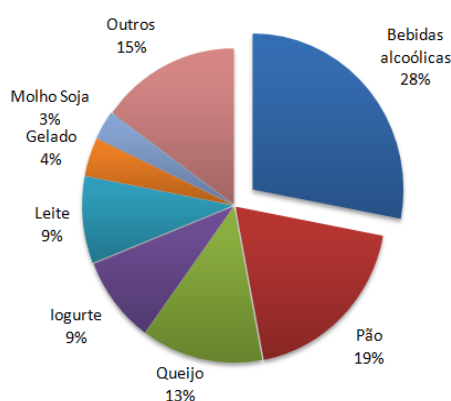


Figura 17 - Níveis de EC em diversos alimentos, adaptação de FSANZ, 2007 [29]

O EC é, assim, um composto que ocorre naturalmente em alimentos fermentados (p.e. pão, iogurte, molho de soja) e bebidas alcoólicas (p.e. vinho, cerveja, bebidas espirituosas), entre outros [30, 31]. Um dos primeiros estudos que demonstrou a formação

Capítulo I - Introdução

de EC durante o processamento de diversos alimentos e bebidas alcoólicas, nomeadamente durante o processo de fermentação dos mesmos, foi publicado em 1976 por Ough *et al.* [32]. No entanto, os níveis de EC encontrados nos alimentos foi na ordem dos µg/L não tendo sido, na altura, considerados preocupantes por parte das autoridades.

Na década de 40 do século XX, o EC era utilizado em Medicina como anestésico; para produzir hipnose e narcose em mamíferos, peixes e anfíbios [33, 34]; e como agente imunodepressivo, com uma dose total de 2-6 g/dia [33]. No entanto, nessa mesma década, foram publicados diversos estudos, de forma extensiva, sobre a toxicidade e carcinogenicidade de EC, sendo que, em 1943, este foi considerado como composto carcinogénico [35]. No entanto, apenas em 1974, o EC foi classificado como possível composto carcinogénico para humanos (grupo 2B) pela *World Health Organization's International Agency for Research on Cancer* (IARC), e como provável carcinogénico para humanos pela *United States Environmental Protection Agency* (EPA US) [30, 31].

Em 1985, apareceram as primeiras preocupações da saúde pública relacionadas com a detecção de EC em bebidas alcoólicas, quando o *Liquour Control Board of Ontario*, Canadá, detectou níveis elevados de EC em brandies e outros licores. Devido ao impacto do EC na saúde, as autoridades do Canadá, nomeadamente o *Departamento de Saúde e Bem-Estar*, deram os primeiros passos no sentido de estabelecer limites sobre o teor de EC em bebidas alcoólicas, os quais se situam entre 30 (vinho de mesa) a 400 µg/L (aguardente de fruta) (Tabela 2) [30, 35]. De acordo com estes limites de referência, os teores de EC em vinhos Madeira devem ser inferiores a 100 µg/L.

Tabela 2 - Limites de EC (µg/L) nas bebidas alcoólicas em diferentes países [30, 35]

País	Vinho de mesa (≤ 14,0 % álc.)	Vinho Fortificado (≥ 14,0 % álc.)	Bebidas espirituosas (≥ 21,0 % álc.)	Saké	Aguardente de fruta
Canadá	30	100	150	200	400
República Checa	30	100	150	200	400
França	-	-	150	-	1000
Alemanha	-	-	-	-	800
Estados Unidos da América	15	60	-	-	-
Suíça	-	-	-	-	1000
Coreia do Sul	30	-	-	-	-

Capítulo I - Introdução

Em certos países não existe legislação específica que inclua os limites máximos de EC em bebidas alcoólicas, nomeadamente em Portugal. Dessa forma, esses países utilizam como referência os valores estabelecidos pelo Canadá.

Dada a preocupação crescente do aparecimento deste composto em diversos alimentos, várias agências/organizações, com competência na área alimentar a nível mundial, têm debatido esta temática. No 64º encontro do *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives* (JECFA), em Fevereiro de 2005 [36], foram avaliados diversos parâmetros tais como toxicidade, níveis e padrões de contaminação alimentar, prevenção e controlo, entre outros, de diversos compostos, nomeadamente do EC. O JECFA concluiu que o EC é genotóxico e carcinogénico em várias espécies, tais como ratos, hamsters e macacos, sugerindo, dessa forma, que este composto poderia ter um potencial risco carcinogénico para os humanos. Em Março de 2007, a IARC decidiu reclassificar o EC como um composto provavelmente carcinogénico para humanos (grupo 2A). A importância no seu estudo é acrescida por esta classificação, uma vez que, caso este seja administrado em doses elevadas, poderá ter efeitos prejudiciais na saúde humana [30, 36, 37].

3 Formação do EC em vinhos

O vinho é, genericamente, uma bebida alcoólica produzida através da fermentação do sumo de uvas, por leveduras. Durante o seu processamento, pode ocorrer a formação de um contaminante designado por carbamato de etilo (EC). O teor de EC depende de diversos factores, tais como concentração de aminoácidos no mosto (influencia a quantidade de precursores), o processo de vinificação e as condições de armazenamento do vinho (temperatura, pH e luz) [35, 38]. De notar que, uma vez formado, o EC é quimicamente estável, não sendo facilmente degradado [39].

Assim sendo, serão abordados, essencialmente, os seguintes factores:

- tipo e quantidade de precursores existentes nas matérias-primas;
- processo de vinificação;
- condições de armazenamento dos vinhos.

Capítulo I - Introdução

3.1 *Precusores existentes nas uvas*

O principal precursor envolvido na formação de EC em vinhos é a ureia, que resulta da degradação da arginina pelas leveduras durante a fermentação alcoólica (ver secção I.3.2). Apesar da falta de informação sobre o teor de arginina em vinhos Madeira ou em uvas usadas na sua produção, um estudo prévio por Pereira *et al.* (2008) [40] mostrou que o vinho Madeira obtido da casta Tinta Negra (aproximadamente 380 mg/L) apresenta teores de arginina elevados quando comparados com as castas Malvasia e Sercial (15 e 47 mg/L, respectivamente). Deste modo, é necessário ter especial atenção com os vinhos obtidos da casta Tinta Negra, devido ao elevado teor de arginina (precursor da ureia) reportado.

3.2 *Processo de vinificação – precursores e factores condicionantes*

Em vinhos existem diversas vias de formação de EC, como se pode observar na Figura 18. O processo de formação de EC prende-se essencialmente com a metabolização da arginina que decorre durante a fermentação alcoólica e maloláctica. No caso particular do vinho Madeira (matriz de estudo deste trabalho), apenas é promovida a fermentação alcoólica; como tal, não será explicada a metabolização da arginina durante a fermentação maloláctica (reações representadas do lado esquerdo da Figura 18).

Durante o processamento dos vinhos (fermentação alcoólica), a ureia pode formar-se por duas formas: metabolização da arginina (Figura 18) e degradação das purinas. O processo de metabolização da arginina passa pela actuação da arginase sobre a arginina (parte do sistema enzimático das leveduras presentes nas uvas), sendo esta convertida em ureia (fonte de azoto para as leveduras) e ornitina. Este processo ocorre durante a fase inicial e intermédia da fermentação alcoólica. A ureia formada é posteriormente metabolizada em amónia e dióxido de carbono; ou pode ser excretada para o mosto, quando ocorre um excesso de ureia no citoplasma das leveduras. Desta forma, a ureia excretada pode eventualmente reagir com o etanol, levando à formação de EC. De notar que o EC é um sub-produto natural nas bebidas alcoólicas fermentadas [41-43]. Outra fonte possível da ureia provém da degradação das purinas. No entanto, apesar de estarem sempre presentes, os níveis de purina e pirimidina encontram-se na ordem dos 10 mg/L, o que se torna insuficiente para servirem como fonte primária de azoto [35, 42, 43].

Capítulo I - Introdução

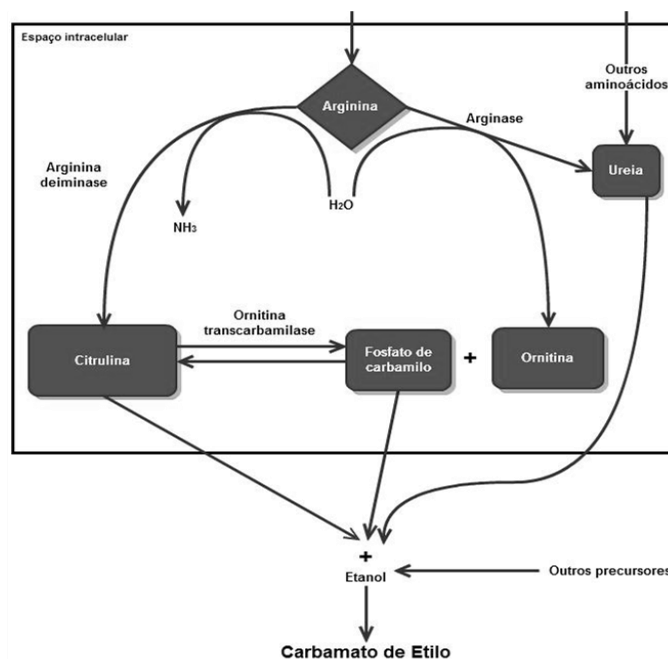


Figura 18 - Possíveis vias de formação do EC em produtos processados [44]

Quando a ureia é excretada para o mosto, esta reage de forma espontânea com o etanol, em meio ácido, levando à formação de EC e amônia; reacção esquematizada na Figura 19.

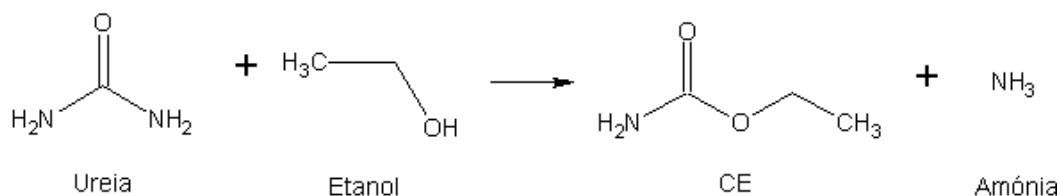


Figura 19 – Formação de EC (meio ácido) pela reacção química entre a ureia e etanol [35]

A primeira demonstração da formação de EC a partir de ureia e etanol foi referenciada no estudo de Jacobson [45], em 1938, em que foi observada a produção de ésteres carbâmicos após o aquecimento de ureia e etanol entre 175 e 190 °C. Em 1976, um estudo publicado por Ough [32] demonstrou a formação de EC em 72 h a partir de ureia e soluções diluídas de etanol (11,5 %) (vinho modelo), sem aquecimento. Esta reacção (Figura 19) é frequente em bebidas alcoólicas, embora a cinética seja moderada à temperatura ambiente. Hasnip *et al.* [46] utilizando vinhos de mesa e fortificados, e Stevens e Ough [47] utilizando vinhos de mesa, demonstraram que a formação de EC a partir da ureia aumenta significativamente com a temperatura, de acordo com a equação de Arrhenius, p.e. um aumento de 10 °C pode aumentar cerca de 3 vezes a cinética de

Capítulo I - Introdução

formação de EC (Figura 20) [47]. Foi demonstrado que a formação de EC a partir do precursor ureia aumenta dramaticamente com a temperatura [35, 48, 49], e mais rapidamente que outros precursores de EC (p.e. N-carbamil aminoácidos, carbonato de dietilo) presentes nos vinhos [46].

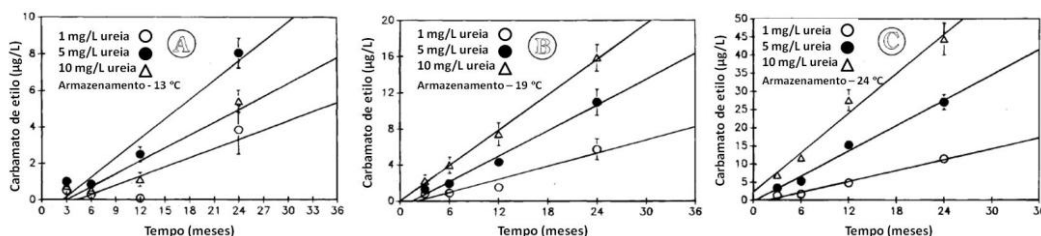


Figura 20 - Efeito do tempo na formação de EC, variando as concentrações de ureia e a diferentes temperaturas (A - 13 °C, B - 19 °C e C - 24 °C) [47]

Um estudo publicado por Ferreira *et al.* [50], em 1992, teve por objectivo seguir a evolução dos níveis de EC em vinhos Madeira durante o processo de estufagem dos mesmos. Para tal utilizaram mostos de Tinta Negra, os quais foram submetidos ao processo de fermentação e estufagem em laboratório. Os resultados evidenciam o aumento do teor de EC durante 3 meses de estufagem, atingindo um teor máximo de 60,5 µg/L em vinho seco. Os resultados sugerem que a fermentação e a estufagem de vinhos Madeira são dois passos críticos para a formação de EC, e que se deverá dar especial atenção na monitorização dos mesmos.

3.3 Armazenamento

O primeiro estudo que verifica a quantidade de EC que se forma durante o armazenamento de vinhos de mesa e fortificados foi publicado por Hasnip *et al.* [46], em 2004. Com a utilização de vinhos modelos, este estudo permitiu obter vários modelos cinéticos, de acordo com o precursor pretendido e o tempo de reacção; foi verificado que a formação de EC é proporcional à concentração de ureia, citrulina e etanol. Além disso aferiu-se uma dependência com a temperatura, pela equação de Arrhenius, sendo que elevadas temperaturas aumentam drasticamente o teor de EC [46, 47]. Outro estudo por Kodama *et al.* [51] com vários tipos de vinho (mesa e fortificados – vinho Madeira e do Porto) reporta o efeito da temperatura na formação de EC durante o armazenamento de vinhos em determinadas condições durante 2 anos. A presença de ureia, mesmo a baixas concentrações (2,7 mg/L), promoveu a formação de quantidades significativas de EC

Capítulo I - Introdução

(entre 6 e 101 µg/L consoante o tipo de vinho e temperatura de armazenamento). Deste modo é aconselhável aplicar temperaturas para envelhecimento dos vinhos e/ou armazenamento inferiores a 24 °C [47] e teores de ureia inferiores a 2 mg/L [51], para minimizar a formação de EC.

Tegmo-Larsson *et al.* [52] (1990), com recurso a vinhos de mesa e fortificados, determinaram que a luz não tem efeitos significativos no aumento da quantidade de EC, quer o vinho seja engarrafado em garrafas transparentes ou verdes, devido à relação tempo/temperatura nos vinhos.

Uthurry *et al.* [53] (2004) evidenciou que vinhos de mesa com mais idade apresentam teores mais elevados de EC do que vinhos novos, sendo que este composto é produzido principalmente a partir da ureia.

Ainda não foram completamente estudados outros tipos de mecanismos de formação de EC, no entanto já foi detectada a presença de EC em mostos não fermentados e em vinhos após o seu engarrafamento (sem que se tenha detectado a presença de ureia, arginina ou citrulina). Uma possível via para a sua formação, poderá estar relacionada com a ureia presente no meio, que poderá se encontrar ligada a outros compostos azotados que se formam durante a fermentação, e que se hidrolisam ao longo do tempo; ocorrerá a libertação da ureia para o vinho, que irá reagir com o etanol, levando à formação do EC [44].

4 Metodologias para determinação de EC em vinhos

A gama de concentração de EC nos diversos alimentos e bebidas é variável, (na ordem dos ng/L aos µg/L), como se pode observar na Tabela 2.

Actualmente, existe um consenso geral de que os níveis de EC em bebidas alcoólicas devem ser inferiores aos valores definidos na Tabela 2, no caso de Portugal seguem-se os limites estabelecidos pelo Canadá (primeiro país a legislar os teores de EC nos diversos tipos de bebidas alcoólicas). As indústrias vnicas têm modificado os seus procedimentos de produção com intuito de reduzir os níveis de EC, mas o problema permanece especialmente em produtos derivados de pequenas destilarias. Para um controlo alimentar eficiente é essencial estabelecer-se um método para determinação de EC adequado para cada bebida alcoólica, de modo a que este seja sensível, específico e rápido. Têm sido várias as abordagens para resolução deste problema. Na Tabela 3 sumarizam-se

Capítulo I - Introdução

algumas das publicações que reflectem as técnicas desenvolvidas e utilizadas para a quantificação de EC em vinhos.

Os procedimentos de determinação de EC normalmente englobam duas fases: uma primeira fase de extracção, onde se efectua um pré-tratamento da amostra para evitar interferências dos componentes da matriz – com vista a aumentar a sensibilidade do método (corresponde a cerca de 80 % do tempo analítico dispendido); seguindo-se, posteriormente, uma fase de análise instrumental e análise do composto.

Tabela 3 - Métodos para quantificação de EC em vinhos

Tipo de Amostra	Padrão Interno	Método de extracção	Método de análise	LOD (µg/L)	LOQ (µg/L)	Gama de linearidade (µg/L)	Ref. bibliográfica
V. mesa; V. fortificados	EC marcado isotopicamente no $^{13}\text{C}_1$, $^{15}\text{N}_1$	LLE com acetona/diclorometano/éter de petróleo + éter etílico/éter petróleo + acetona	GC-HECD GC-MS/MS	20	-	-	[54]
V. mesa; V. Porto	EC marcado isotopicamente no $^{13}\text{C}_1$, $^{15}\text{N}_1$	LLE + acetato de etilo	GC-MS/MS	-	-	-	[55]
V. mesa; V. Porto	-	LLE com diclorometano + centrifugação + acetato de etilo	GC-MS	5	-	-	[56]
V. mesa e fortificado	EC-d5 (deuterado)	Destilação + LLE com diclorometano	GC-MS	2-5	-	0-200	[57]
V. Madeira	BC ² e Tetradecanoato de Metilo	LLE com éter etílico + centrifugação + acetato de etilo	GC-MS	-	-	100-1000	[50]
V. mesa; V. Porto	EC marcado isotopicamente no $^{13}\text{C}_1$, $^{15}\text{N}_1$	SPE + centrifugação + acetato de etilo	MDGC-MS	0,1	1	0,387-1160	[48]
V. mesa V. fortificados	-	Derivatização com 9-xantidrol	HPLC	4,2	-	-	[58]
Vinhos	-	HS-SPME (fibra CW-DVB, 30 min. de extracção)	GC-MS	9,6	-	10-80	[59]
V. mesa; V. fortificados	-	Sem informação disponível	GC-MS ³ HPLC-FLD	-	-	-	[60]
Vinhos	EC-d5	HS-SPME (fibra CW-DVB, 71 °C e 60 min. de extracção)	GC-MS	3	10	10-160	[61]
V. Madeira	-	HS-SPME (fibra DVB-CAR-PDMS, 60 °C e 20 min. de extracção)	GC × GC-ToFMS	4,31 ⁴ 2,75 ⁵	14,38 9,16	4,59-367,20 8,89-547,20	[62]

² Carbamato de butilo

³ Em alguns ensaios foi utilizada a Injecção Directa

⁴ Vinho seco

⁵ Vinho doce

Capítulo I - Introdução

Pela Tabela 3 é possível verificar que existem várias metodologias para extracção/concentração de EC em vinhos, nomeadamente a extracção líquido-líquido (LLE), a extracção em fase sólida (SPE) e microextracção em fase sólida (SPME). Como técnicas de análise do composto, as metodologias mais vulgarmente utilizadas são a cromatografia em fase gasosa (GC) e a cromatografia em fase líquida de alta eficiência (HPLC).

Observa-se que a primeira técnica de extracção utilizada foi a extracção líquido-líquido (LLE). Os solventes orgânicos vulgarmente utilizados são diclorometano, éter etílico e acetato de etilo. Esta técnica necessita a utilização de solventes orgânicos que são tóxicos podendo levar à poluição ambiental e custos extra no tratamento dos efluentes [50, 54-57].

Em 2002, surge na literatura um artigo que referencia como método extractivo, a extracção em fase sólida (SPE) [48]. Esta técnica é mais rápida que a LLE, de fácil execução, menos laboriosa, requer menos quantidades de solventes orgânicos e evita a formação de emulsões. No entanto, apresenta baixa reprodutibilidade [61]. O método oficial de análise adoptado actualmente pela *Comissão Europeia* e pelo *Office International de la Vigne et du Vin* (OIV) utiliza a SPE como técnica extractiva, sendo que o EC é detectado/quantificado por GC-MS (cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massa) [60].

A técnica mais recente que tem sido utilizada como extracção de EC é a microextracção em fase sólida (SPME). É uma técnica simples; o seu procedimento pode ser facilmente automatizado, uma vez que possibilita combinar extracção e concentração num único passo, reduzindo drasticamente o tempo de extracção de uma amostra [61, 62].

Todas estas técnicas descritas anteriormente (LLE, SPE e SPME) são seguidas de uma fase de análise instrumental. Desde o início dos anos 60 que a técnica analítica mais disseminada para a detecção e análise de EC em vinhos tem sido a cromatografia unidimensional em fase gasosa (1D GC). É uma técnica que permite a separação de compostos voláteis ou semi-voláteis. No entanto, ao fazer-se a análise dos cromatogramas gerados, frequentemente ocorrem situações de co-eluição de compostos, dificultando, posteriormente, uma identificação e quantificação correcta dos analitos pelo detector seleccionado [61]. Acoplado ao equipamento de 1D GC existe um detector, sendo que os mais vulgarmente utilizados são os detectores de massa, uma vez que permitem uma grande selectividade, sensibilidade e fornecem informações estruturais pertencentes aos

Capítulo I - Introdução

compostos eluídos na coluna, possibilitando, dessa forma, uma identificação inequívoca e precisa de EC em níveis vestigiais ($\mu\text{g/L}$).

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) acoplada a um detector de fluorescência (FLD) [60, 63] ou espectrometria de massa tandem (MS/MS) [64] têm sido utilizadas para detectar EC em vinhos, como alternativa ao 1D GC. Estas técnicas só podem ser utilizadas para determinação semi-quantitativa (é necessária uma análise de um número elevado de amostras para que este método possa ser calibrado), e requerem a derivatização do composto com 9-xantidrol [35, 61].

Apesar destas técnicas serem relativamente sensíveis, nos últimos anos tem sido feita uma pesquisa considerável dedicada a combinações de metodologias independentes com o objectivo de reforçar o poder de resolução das mesmas. Surgiu, assim, a cromatografia compreensiva bidimensional em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa por tempo de voo ($\text{GC} \times \text{GC-ToFMS}$), como uma ferramenta útil para a quantificação directa de EC em vinhos, reduzindo significativamente o tempo de análise, quando comparando com o HPLC ou o 1D GC. [62].

Comparando as metodologias descritas na Tabela 3, a metodologia de SPE/MDGC-MS (extração em fase sólida/cromatografia em fase gasosa multidimensional acoplada à espectrometria de massa) utilizada por Jagerdeo *et al.* [48], foi a que apresentou menores limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ), 0,1 e 1 $\mu\text{g/L}$ respectivamente. Estes valores são bastante inferiores comparativamente aos restantes dado que nesse trabalho álcool da amostra é removido para posteriormente se extrair e concentrar o EC; não há, assim, efeito do álcool na matriz. Quanto às metodologias que utilizam o HS-SPME como técnica extractiva, pode verificar-se que quando se utiliza o GC-MS para análise do EC, os valores de LOD são superiores para Whiton *et al.* [59] do que para Zhang *et al.* [61], 9,6 e 3 $\mu\text{g/L}$ respectivamente. Quando se utiliza o HS-SPME como técnica extractiva e o $\text{GC} \times \text{GC-ToFMS}$ como técnica de análise, os valores de LOD e LOQ obtidos por Perestrelo *et al.* [62] são similares com os obtidos por Zhang *et al.* [61] (utilizam o GC-MS como técnica de detecção), 2,75 e 3 $\mu\text{g/L}$ (LOD), 9,16 e 10 $\mu\text{g/L}$ (LOQ), respectivamente. No entanto, o tempo de extração utilizado por Zhang *et al.* [61] é três vezes superior ao de Perestrelo *et al.* [62] havendo assim uma redução no tempo de extração e de análise no GC; assim como utilizam a monitorização do ião selectivo (SIM) em detrimento do cromatograma de iões totais (TIC) utilizado por Perestrelo *et al.* [62]. A análise do cromatograma em TIC permite simultaneamente obter o perfil volátil global dos vinhos,

Capítulo I - Introdução

como do analito alvo (EC) em níveis vestigiais. Verifica-se assim, que a metodologia HS-SPME/GC \times GC-ToFMS permite uma boa detecção e quantificação de EC em vinhos.

Para quantificação de um composto, é usual usar-se um padrão interno como referência, sendo que para a quantificação de EC os mais comuns são: o carbamato de propilo (PC) e o carbamato de butilo (BC). Além disso, é usual fazer-se uma monitorização do ião selectivo (SIM) característico do espectro de massa de EC (m/z 44, 62 e 74), uma vez que a detecção torna-se mais sensível pelo aumento da razão sinal/ruído (S/N) (apenas se selecciona os iões de interesse entre aqueles que se encontram presentes na matriz). Desta forma é possível aumentar-se o limite de detecção de um composto que se encontra em níveis vestigiais [38, 65].

De seguida, encontra-se um breve resumo sobre os fundamentos teóricos da metodologia aplicada neste trabalho experimental: microextração em fase sólida em modo espaço de cabeça combinada com cromatografia compreensiva bidimensional em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa por tempo de voo – HS-SPME/GC \times GC-ToFMS.

4.1 Técnica extractiva – SPME

No início dos anos 90, surgiu uma técnica alternativa à LLE e SPE com a particularidade de não requerer solventes orgânicos, a microextração em fase sólida (SPME) desenvolvida por Janusz Pawliszyn e seus colaboradores. Esta técnica permite recolher compostos alvo de uma matriz complexa num curto espaço de tempo (aumento de produtividade), assim como a análise directa da amostra sem manipulação prévia, evitando perdas de analitos e a ocorrência de artefactos. Não ocorre uma remoção exaustiva dos analitos para o revestimento da fibra, havendo trocas entre a matriz da amostra e o revestimento da fibra. Uma vez que as amostras não necessitam de ser concentradas para posterior análise, previne-se, desse modo, a perda de compostos voláteis com baixo ponto de ebulição. Além disso permite a detecção de compostos que normalmente não eram possíveis, pois eram co-eluídos com o solvente [39, 66].

Dada a sua versatilidade e simplicidade, as aplicações desta técnica têm abrangido diversas áreas, nomeadamente ambiental, higiene industrial, monitorização de processos e análises clínicas, forenses e alimentares. A sua primeira aplicação data de 1989 com o intuito de avaliar a presença de poluentes ambientais em água. Primeiramente era usada a

Capítulo I - Introdução

amostragem por imersão directa (DI) em matrizes líquidas, alternativamente à LLE; posteriormente começou a abordar-se a análise em espaço cabeça (HS) para alimentos sólidos e líquidos e para fluidos biológicos [67]. Quanto à aplicação em vinhos, os estudos publicados têm permitido analisar uma grande diversidade de compostos voláteis, assim como nas restantes bebidas alcoólicas [68-70]. Esta técnica pode, então, ser utilizada de duas formas: o modo de imersão directa (DI-SPME) e o modo em espaço de cabeça (HS-SPME), representados na Figura 21.

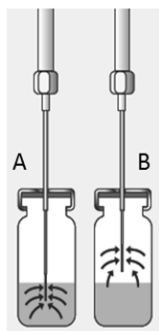


Figura 21 - Modo de extração directa (DI-SPME, A) e modo de extração em espaço de cabeça (HS-SPME, B)

Quando se opera em modo DI-SPME significa que a fibra é colocada directamente numa matriz líquida e o analito é transferido directamente da matriz para o revestimento da fibra. No modo de HS-SPME, os analitos (que devem ser relativamente voláteis) migram primeiramente para o espaço-cabeça, e posteriormente para o revestimento da fibra (Figura 22), uma vez que a fibra é exposta na fase de vapor acima da amostra gasosa, líquida ou sólida. Após recolha da fibra, esta é inserida num instrumento analítico, normalmente um cromatógrafo. Este tipo de técnica (HS-SPME) permite proteger o revestimento da fibra uma vez que não há contacto directo com a matriz [66, 71].

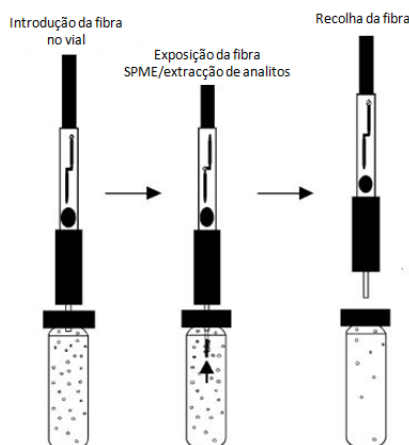


Figura 22 - Procedimento de extração por HS-SPME [72]

Capítulo I - Introdução

A eficiência de extracção dos analitos é influenciada por diversos parâmetros tais como agitação, *salting out*, temperatura, entre outros. A agitação promove a transferência dos analitos da matriz da amostra para o revestimento da fibra, diminuindo assim o tempo de extracção. No que confere ao *salting out*, a saturação da amostra com um sal (p.e. cloreto de sódio) promove a eficiência de extracção, uma vez que há diminuição da solubilidade dos compostos na matriz, aumentando a sua concentração no espaço-cabeça. O efeito de *salting-out* é igualmente possível com outros tipos de compostos, como é o caso da glucose. Robinson et al. [73] demonstra que a glucose aumenta a concentração de compostos no espaço-cabeça, evitando efeitos de viscosidade. O aumento da temperatura de extracção incrementa a eficiência de extracção, sendo necessário encontrar a temperatura adequada para se obter uma sensibilidade apropriada, assim como uma boa velocidade de extracção, sem que ocorra a formação de artefactos [71].

4.2 Técnica cromatográfica – GC \times GC-ToFMS

Após a fase extractiva (procedimento na secção I.4.2), a fibra de SPME é introduzida, neste caso, no equipamento GC \times GC-ToFMS, onde os analitos são termicamente desorvidos da fibra (Figura 23), e transferidos para o interior do equipamento. Durante a desorção do analito, a fase polimérica é limpa podendo posteriormente ser reutilizada [66].

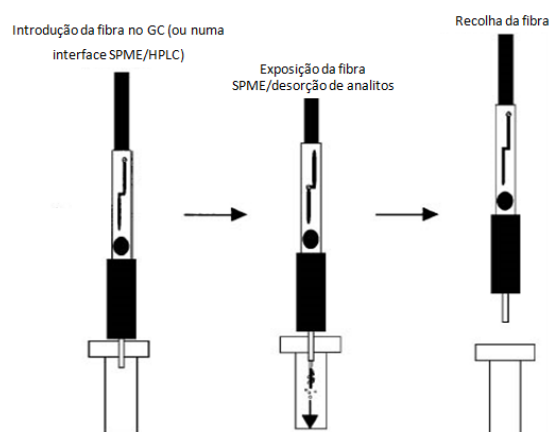


Figura 23 - Procedimento de desorção de HS-SPME num cromatógrafo [72]

A cromatografia compreensiva bidimensional em fase gasosa, GC \times GC, é uma técnica de separação multidimensional que permite a análise de amostras complexas ou analitos alvo em quantidades vestigiais. Esta técnica foi descrita inicialmente pelo

Capítulo I - Introdução

professor John B. Phillips e seu aluno Zaiyou Liu, em 1991. A quantidade de dados gerados é enorme, sendo portanto necessário o desenvolvimento de softwares específicos, assim como o uso de ferramentas quimiométricas.

No interior do equipamento (Figura 24) existem duas colunas cromatográficas que operam em mecanismos diferentes, ou seja, encontram-se revestidas por fases estacionárias distintas. Existem várias combinações possíveis, sendo que a mais comum é a utilização de uma coluna não polar e outra polar. Geralmente a composição da fase estacionária da primeira coluna é menos polar do que a da segunda coluna, o que faz com que a separação na primeira coluna seja regulada pelos pontos de ebulição dos analitos (volatilidade), e na segunda haja um fraccionamento pela polaridade destes (no entanto existem outras combinações). As colunas encontram-se acopladas a uma interface especial, o modelador, que tem a capacidade de recolher o efluente da primeira coluna e, periodicamente, introduzi-lo na segunda coluna [72, 74].

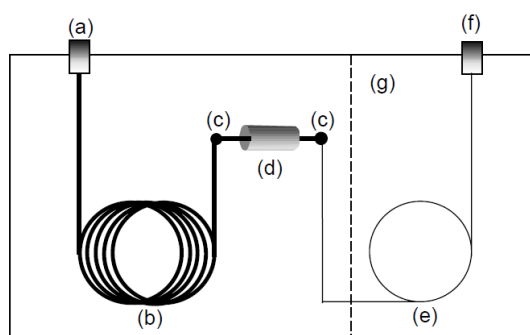


Figura 24 – Diagrama conceptual do um sistema GC \times GC. (a) injetor; (b) coluna de primeira dimensão; (c) conector da coluna; (d) modelador; (e) coluna de segunda dimensão; (f) detector; (g) forno da segunda coluna (opcional) [74]

O GC \times GC tem melhor resolução, mais sensibilidade e permite obter melhores limites de detecção, quando comparando com o 1D GC [62, 74, 75].

Uma vez que a segunda coluna do GC \times GC produz picos a uma velocidade bastante rápida, sendo estes tão estreitos como 0,1 s, exige-se uma técnica de detecção que consiga detectar estes picos adequadamente. Este era um problema que os espectrómetros de massa clássicos não conseguiam resolver, pois apenas conseguiam uma velocidade de 50 espectros/s. Como primeira abordagem foram utilizados o FID (ionização de chama) e outros detectores selectivos, como o ECD (captura de electrões), NCD (quimioluminescência de azoto) e NPD (azoto-fósforo). Espectrómetros de massa de elevada resolução quádruplos e magnéticos também foram acoplados ao GC \times GC, no

Capítulo I - Introdução

entanto o seu funcionamento era demasiado lento [75]. Assim surgiu a espectrometria de massa por tempo de voo, ToFMS, que permite obter uma velocidade de 500 espectros/s, conseguindo, dessa forma, colmatar as necessidades de processamento dos dados obtidos pelo GC \times GC. Para além disso, o ToFMS consegue obter um espectro de massa total ao nível de sensibilidade de analitos vestigiais, ao contrário do MS/MS. Consegue, também, desconvulsionar os espectros com picos co-eluídos [62, 75]. Na Figura 25 é possível visualizar-se uma representação esquemática da metodologia aplicada neste trabalho.

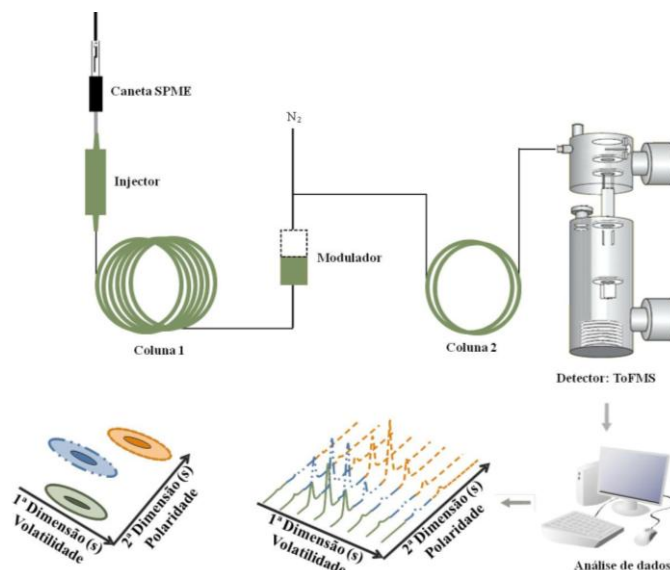


Figura 25 - Esquema representativo da metodologia HS-SPME/GC \times GC-ToFMS [76]

5 Objectivos

A União Europeia inclui o EC num grupo de contaminantes definidos como substâncias que não são intencionalmente adicionadas aos alimentos, mas cuja presença geralmente tem um impacto negativo na qualidade dos alimentos e pode implicar um risco para a saúde humana. Assim sendo, é normal que o mercado externo actual exija padrões de qualidade mais rigorosos para que se desenvolvam novas tecnologias na produção destes alimentos, com particularidade para as bebidas alcoólicas.

Uma vez evidenciados teores elevados deste composto em alimentos e bebidas alcoólicas, o JECFA mostrou que as vias recomendadas para o sucesso da prevenção e controlo do EC nestes produtos passam:

- i) pela identificação dos precursores responsáveis pela produção de EC;

Capítulo I - Introdução

ii) pelo conhecimento da influência dos principais factores externos, tais como a luz, a temperatura e o tempo de armazenamento dos alimentos [36].

Assim, esta Tese de Mestrado tem como objectivo intervir ao nível do processo de produção do vinho Madeira, tentando criar condições para redução dos teores do EC. Como complemento surgiu o desafio de solucionar o problema do aumento da acidez com o envelhecimento dos vinhos, como forma de melhoramento da estabilidade do produto.

Os objectivos desta Tese de Mestrado consistem (Figura 26):

a) No estudo de factores intrínsecos e extrínsecos aos vinhos Madeira que influenciam a formação de EC, nomeadamente:

- a casta e tipo de vinho;
- o processo de estufagem;
- as condições de armazenamento (luz, temperatura e tempo).

b) No estudo do impacto do teor e do tipo de açúcar na cinética de formação do EC em vinhos modelo;

c) Análise dos ácidos orgânicos voláteis presentes em vinhos Madeira.

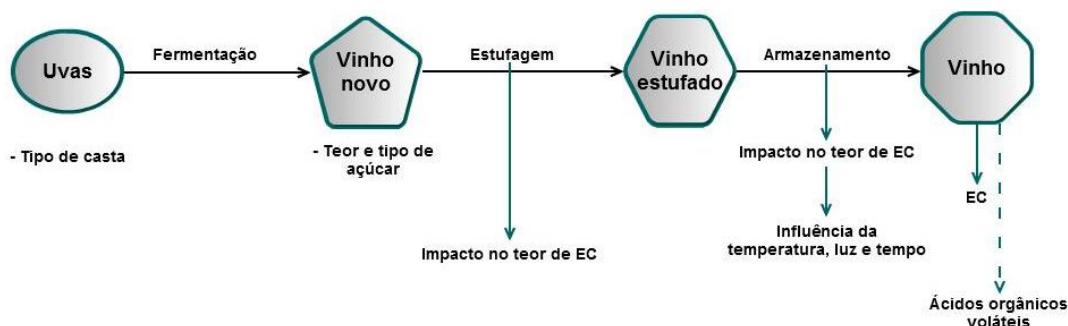


Figura 26 - Tópicos de estudo da Tese de Mestrado

Capítulo II. Materiais e Métodos

Capítulo II - Materiais e métodos

1 Materiais e Reagentes

Como padrões foram utilizados: o carbamato de etilo (99 %) e o carbamato de propilo (> 98 %) da Sigma-Aldrich Química S.A. (Madrid, Espanha).

O carbamato de etilo (CAS nº 51-79-6), igualmente conhecido como uretano, é um éster etílico do ácido carbâmico; tem a fórmula química de $\text{H}_2\text{NCOOC}_2\text{H}_5$, estando a sua estrutura química representada na Figura 27. Como substância pura, apresenta-se na forma de cristal incolor, inodoro; tem um ponto de fusão entre 48 e 50 °C, um ponto de ebulição entre 182 e 184 °C e massa molecular de 89,09 g/mol. É um composto altamente solúvel em diferentes solventes, tais como água, álcoois, éter, cetonas, ésteres e solventes halogenados [33].

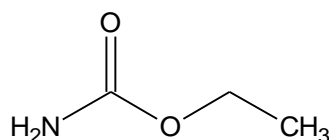


Figura 27 - Estrutura química do carbamato de etilo (EC)

Foi utilizada a ureia (> 99%, Sigma-Aldrich Química S.A.), a glucose (99%, Sigma-Aldrich Química S.A), o etanol (99,5 %, Panreac), o glicerol (99,5 %, Sigma-Aldrich Química S.A), o cloreto de sódio (NaCl, Empresa José M. Vaz Pereira, Ltd. (Lisboa, Portugal)), o ácido tartárico (Empresa José M. Vaz Pereira, Ltd.), o hidróxido de sódio (NaOH, 98,7 %, Empresa José Manuel Gomes dos Santos) e uma solução de alcanos compreendida entre C_8 - C_{20} da Fluka.

Foi utilizado um suporte manual de SPME da Supelco Inc. (Bellefonte, PA, USA), com o revestimento de divinilbenzeno-carboxeno-polidimetilsiloxano (DVB-CAR-PDMS, 50/30 µm de espessura da fase estacionária).

2 Amostras

Na Tabela 4 encontram-se as amostras de vinho Madeira utilizadas neste trabalho experimental, assim como a casta a partir da qual foi produzido, ano e tipo de vinho. Estas amostras foram cedidas por duas empresas.

Capítulo II - Materiais e métodos

Tabela 4 - Amostras de Vinhos Madeira fornecidas por duas empresas

Produtor	Casta	Tipo de vinho	Blend (anos) ⁶	Indicação Idade ⁷
A	Malvasia	Doce	10, 15, >40	2009, 1998
	Bual	Meio Doce	10, 15	2005, 1995
	Verdelho	Meio Seco	10, 15, 20	1995
	Sercial	Seco	10, 15	2005, 1995, 1979
	Tinta Negra	Doce	3	2009, 2006
B	Sercial	Seco		2009
	Tinta Negra	Seco		2010, 2009
		Doce		2010, 2009
	Bual	Meio Doce	5 amostras*	

As amostras utilizadas neste estudo consistem em dois tipos distintos: vinhos comerciais (disponíveis no mercado) e vinhos experimentais (processo de vinificação em curso). As amostras da casta Tinta Negra do tipo seco (fermentado durante 7/8 dias) e doce (fermentado durante 2 dias) do ano 2010, foram colhidas antes e após o processo de estufagem (3 meses a uma temperatura de 45 ± 5 °C); o vinho Sercial foi fermentado durante 8 dias e sofreu o processo de canteiro (temperatura ambiente).

3 Metodologia global

3.1 Procedimento de HS-SPME

A metodologia adoptada neste trabalho experimental foi baseada em Perestrelo *et al.* [62] quer na quantificação do EC, assim como na identificação dos ácidos orgânicos voláteis. No que se refere à quantificação do EC, usou-se o carbamato de propilo (PC) como padrão interno com a finalidade de normalizar os resultados obtidos e reduzir a variabilidade na quantificação do EC. Num balão volumétrico de 5 mL, foi adicionado 405 µL de PC (1580 µg/L) e perfez-se o volume com amostra de vinho Madeira. Para efectuar

⁶ Mistura de vinhos com uma idade aparente

⁷ Vinhos de apenas um tipo de casta e de uma colheita

* Idade do vinho não disponível

Capítulo II - Materiais e métodos

a quantificação do EC, assim como para a extracção dos ácidos orgânicos voláteis, num vial de 5 mL adicionou-se 1 mL de amostra juntamente com 0,5 g de NaCl. Os vials foram fechados com um septo de PTFE e uma tampa de rosca. Antes da extracção, o vial foi colocado durante 5 minutos num banho de água termostatizado ($60\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,1$), sob agitação de 400 rpm. Após este tempo, procedeu-se à exposição da fibra DVB-CAR-PDMS durante 20 minutos (condições de SPME na Tabela 5). Por fim, recolheu-se a fibra para o interior do suporte e injectou-se no injectador do GC \times GC-ToFMS. Cada amostra foi analisada em triplicado. De notar que o revestimento da fibra foi condicionado a uma temperatura de $270\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 2 horas, tal como recomendado pelo produtor. Antes da primeira utilização diária, a fibra foi condicionada a $250\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 10 min.

Tabela 5 - Condições da SPME

Tipo de Fibra	DVB-CAR-PDMS
Temperatura de extracção	$60\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,1$
Volume da amostra	1 mL
Agitação	400 rpm
Tempo de equilíbrio	5 min
Tempo de extracção	20 min

3.2 Análise por GC \times GC-ToFMS

A quantificação do EC, assim como identificação dos ácidos orgânicos voláteis, foi realizada num sistema de cromatografia compreensiva bidimensional em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa por tempo de voo, (GC \times GC-ToFMS), constituído por um cromatógrafo de gás da Agilent (7890N), com um modelador criogénico com 2 jactos (licenciado pela Zoex) e um forno secundário – LECO Pegasus 4D. A fibra foi introduzida no injectador do cromatógrafo, onde permaneceu durante 3 minutos para permitir a desorção térmica dos compostos.

O injectador do cromatógrafo estava equipado com um liner de 0,75 mm de diâmetro interno, tendo a análise decorrido em modo *splitless* (3 min). As colunas capilares de sílica fundidas utilizadas na primeira e segunda dimensão foram HP-5 (30 m \times 0,32 mm diâmetro interno \times 0,25 μm de espessura de filme) (J&W Scientific Inc., Folsom, CA, USA) e DB-FFAP (0,79 m \times 0,25 mm diâmetro interno \times 0,25 μm de espessura de filme) (J&W Scientific Inc., Folsom, CA, USA), respectivamente.

Capítulo II - Materiais e métodos

Tabela 6 - Condições do GC × GC e do ToFMS

GC × GC

Coluna Primária	HP-5 30 m x 0,32 mm; 0,25 µm (espessura de filme)
Coluna Secundária	DB-FFAP 0,79 m x 0,25 mm; 0,25 µm (espessura de filme)
Forno primário	40 °C (1 min) 40 °C até 230°C a 10 °C/min 230 °C (2 min)
Forno secundário	70 °C (1 min) 70°C até 250°C a 10 °C/min 250 °C (3 min)
Gás de arraste	Hélio com fluxo de 2,50 mL/min
Injector	<i>Splitless</i> (3 min), liner 0,75 mm, 250 °C
Tempo de Modelação	6 s

ToFMS

Aquisição de espectros	125 espectros/s
Impacto electrónico	70 eV
Intervalo m/z	33-350
Voltagem	-1695 V
Temperatura do Modelador	20 °C offset (acima do forno primário)

O forno primário foi programado para uma temperatura inicial de 40 °C durante 1 min, sendo depois aquecido até à temperatura de 230 °C (2 min) a uma velocidade de 10 °C/min. A temperatura do forno secundário foi programada para aumentar de 70 °C (1 min) até 250 °C (3 min) a uma velocidade de 10 °C/min. O gás de arraste utilizado foi o hélio a um fluxo de 2,50 mL/min. A temperatura da transferência de linha do MS foi de 250°C, assim como a temperatura da fonte. O tempo de modelação foi de 6 s; a temperatura do modelador foi mantida a 20 °C offset (acima do forno primário). O ToFMS foi operado a uma velocidade de aquisição de espectros de 125 espectros/s. O espectrómetro de massa operou em modo de impacto electrónico a 70 eV usando um intervalo de 33-350 m/z e a voltagem de -1695V (condições do GC × GC e do ToFMS na Tabela 6).

Capítulo II - Materiais e métodos

3.3 Processamento de dados

Foram adoptadas duas estratégias para o processamento de dados: uma para a quantificação do EC e outra para a identificação dos ácidos orgânicos voláteis. No caso dos ácidos orgânicos voláteis, foram analisados os cromatogramas de iões totais (TIC), que foram processados utilizando um software de processamento automatizado denominado ChromaTOF (LECO), com um limite de sinal/ruído (S/N) de 100. No caso do EC, para avaliar a qualidade da separação, em geral, e a para fazer a identificação manual dos picos foram utilizados os diagramas de contornos em modo de extracção de ião m/z 62, com um sinal/ruído (S/N) de 10.

A identificação foi realizada pela análise dos espectros de massa e depois comparados com os espectros de massa existentes nas livrarias NIST e Wiley disponíveis no software do GC \times GC–ToFMS. Previamente foi feita a análise dos espectros de massa dos padrões disponíveis no laboratório (secção II.1), para uma comparação com os espectros de massa obtidos. Para cada composto identificado foi calculado o Índice de Kovats correspondente (RI), sendo este comparado com os valores descritos na literatura para o mesmo tipo de coluna ou equivalente. Os RI foram calculados com base na expressão matemática que se segue, sendo os tempos de retenção (TR) obtidos através de uma série de alcanos (C₈ - C₂₀):

$$RI = \left[\left(\frac{TR_p - TR_{ant}}{TR_{post} - TR_{ant}} \right) + Cn_{ant} \right] \times 100$$

RI - Índice de retenção

TR_p - Tempo de retenção do pico de interesse

TR_{ant} - Tempo de retenção do alcano anterior

TR_{post} - Tempo de retenção do alcano posterior

Cn_{ant} - Número de carbonos do alcano anterior

A cada composto identificado por HS-SPME/GC \times GC–ToFMS corresponde uma área cromatográfica, obtida pela média das 3 réplicas efectuadas para cada amostra. A reprodutibilidade das réplicas foi expressa pelo desvio padrão relativo (RSD, %) nas tabelas e pelas barras de erro nos gráficos (desvio padrão).

Após obtenção das áreas cromatográficas, e com recurso à curva de calibração efectuada previamente (secção II.4.1) foi calculada a concentração de EC (µg/L) presente nas amostras. A curva de calibração foi construída pela razão entre áreas vs concentrações.

Capítulo II - Materiais e métodos

Com recurso à regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLS), um método estatístico de análise multivariada, foi efectuado um modelo com as áreas cromatográficas de ácidos orgânicos voláteis (matriz x) e a idade dos vinhos (matriz y). O modelo foi obtido utilizando o software Cats.

Para calcular o erro do modelo foi utilizado o RMSEC (Root Mean Square Error Calibration), conforme a equação seguinte, onde n é o número de amostras (vinhos), y_i é a idade estimada da amostra dentro dos valores utilizados para o modelo e o y'_i é a idade real do vinho:

$$RMSEC (\%) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - y'_i)^2}{n}}$$

4 Aplicação da metodologia

4.1 Curva de calibração

Para se quantificar o EC, foram efectuadas duas curvas de calibração utilizando diferentes teores de glucose representando, dessa forma, os diversos tipos de vinho Madeira: 57,0 e 115 g/L para vinhos secos/meio secos e doces/meio doces, respectivamente. Para tal, foram preparados vinhos sintéticos secos e doces compostos por: ácido tartárico (5 g/L), glicerol (7 g/L), glucose (57,0 g/L para os secos/meio secos; 115 g/L para os doces/meio doces), 18 % em etanol (v/v) ajustados ao pH de 3,5 com uma solução de NaOH (2 M).

Além disso, foram preparadas soluções padrão etanólicas a partir da solução mãe de EC (6100,0 µg/L) com os seguintes concentrações: 64,8; 129,6; 243,0; 486,0; 810,0 e 1620,0 µg/L para vinhos secos/meio secos, e 64,8; 162; 486; 810; 1620 e 2430 µg/L para vinhos doces/meio doces.

Num balão volumétrico de 5 mL, foi adicionado 405 µL de PC (1580 µg/L), perfazendo-se o volume com solução de vinho sintético. Dessa forma, procedeu-se à análise por HS-SPME/GC × GC–ToFMS, descrito na secção II.3.

4.2 Avaliação de diferentes parâmetros na cinética de formação de EC em vinhos Madeira e em vinhos modelo

Com o intuito de avaliar a cinética de formação de EC, foram efectuados 4 estudos distintos em dois tipos de amostras: vinhos Madeira e vinhos modelo (Figura 28).

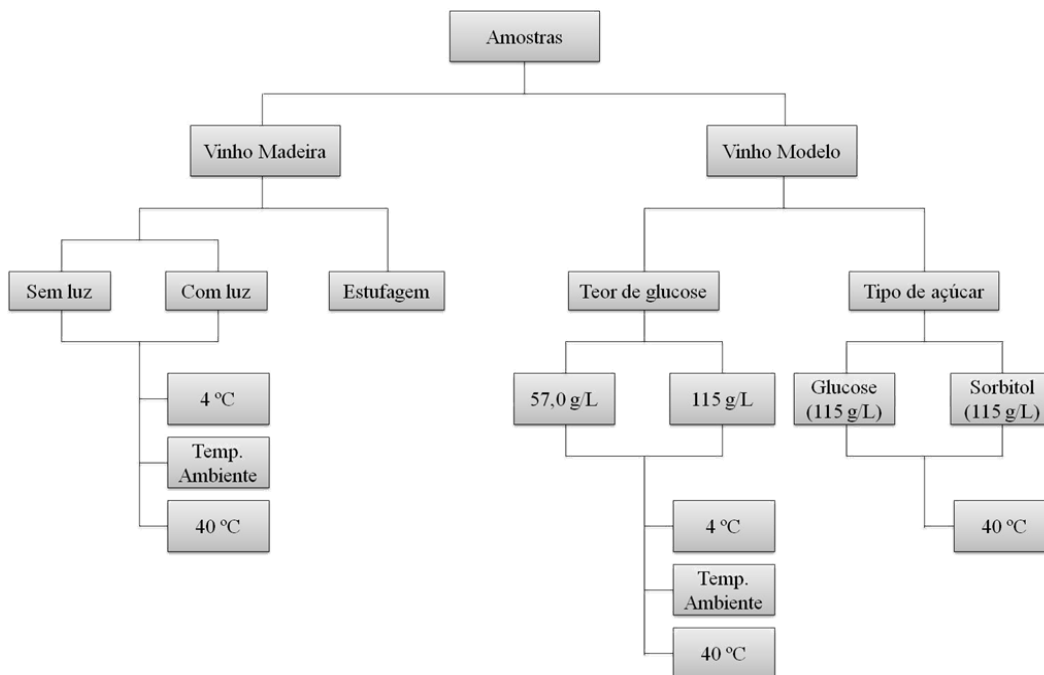


Figura 28 - Esquema representativo dos diferentes estudos efectuados para análise da cinética de formação de EC

Efeito das condições de armazenamento em vinhos Madeira: Uma amostra de vinho Madeira da casta Tinta Negra do tipo doce (2009) foi adicionada em frascos de âmbar (simulação das garrafas de vinho), para se verificar a influência de três parâmetros: a ausência/presença de luz, a variação de temperatura de armazenamento (4°C, temperatura ambiente e 40 °C) e o tempo do armazenamento.

Efeito do processo de estufagem em vinhos Madeira: Foram cedidas amostras de vinho da casta Tinta Negra do tipo doce e seco de 2010, antes e após estufagem. Com esta análise pretende-se analisar o efeito da estufagem no teor de EC nos vinhos Madeira.

Efeito do teor de glucose em vinhos modelo: Foram preparados vinhos modelo com diferentes teores de glucose (57,0 e 115 g/L) e com ureia (10 mg/L), sendo que estes foram adicionados em frascos de âmbar. Este estudo pretende verificar qual a influência do

Capítulo II - Materiais e métodos

teor de açúcar na cinética de formação do EC em vinhos. O procedimento para preparação dos vinhos modelo foi similar ao descrito na secção II.4.1.

Efeito do tipo de açúcar em vinhos modelo: Foram preparados dois vinhos modelo: um com glucose (115 g/L) e outro com sorbitol (115 g/L), em ambos foi adicionada ureia (10 mg/L). O procedimento para preparação dos vinhos modelo foi similar ao descrito na secção II.4.1. Estas amostras foram colocadas em vials de âmbar a uma temperatura de 40 °C. Estes dois açúcares são estruturalmente semelhantes, à excepção de um grupo carbonilo (Figura 35), daí que este estudo foi efectuado com o intuito de perceber a influência do grupo carbonilo na cinética de formação do EC em vinhos Madeira.

Para cada um destes efeitos, foi retirado 1 mL de amostra do vial correspondente, para análise pela metodologia HS-SPME/GC × GC–ToFMS, descrita na secção II.3.

5 Determinação da acidez total de vinho Madeira

Para determinar a acidez total de vinho Madeira, seguiu-se o regulamento 2676/90/ECC de 17 de Setembro de 1990 que consiste, primeiramente, na calibração do pH a 20 °C usando uma solução tampão de 4 e outra de 7. De seguida adicionou-se num gobelé 10 mL de vinho e 10 mL de água destilada. Procedeu-se ao ajuste do pH da solução para 7 com uma solução de NaOH 0,1M (esta solução deve ser adicionada lenta e constantemente). No final, registou-se o volume de NaOH adicionado (mL).

De seguida, para se proceder ao cálculo da acidez total (AT), substitui-se o valor do volume de NaOH adicionado na seguinte equação:

$$AT = 0,075 \times 10 \times V(NaOH) = x \frac{g}{L} \text{ ácido tartárico}$$

Capítulo III. Resultados e Discussão

1 Validação da metodologia HS-SPME/GC \times GC-ToFMS para a determinação de EC em vinhos Madeira

A metodologia utilizada neste trabalho experimental foi baseada na metodologia desenvolvida por Perestrelo *et al.* [62], no entanto foi adicionado um padrão interno – o carbamato de propilo (PC). O PC foi utilizado para minimizar a variabilidade dos resultados obtidos, uma vez que há normalização dos resultados pela razão das áreas entre o analito (EC) e o padrão interno (PC).

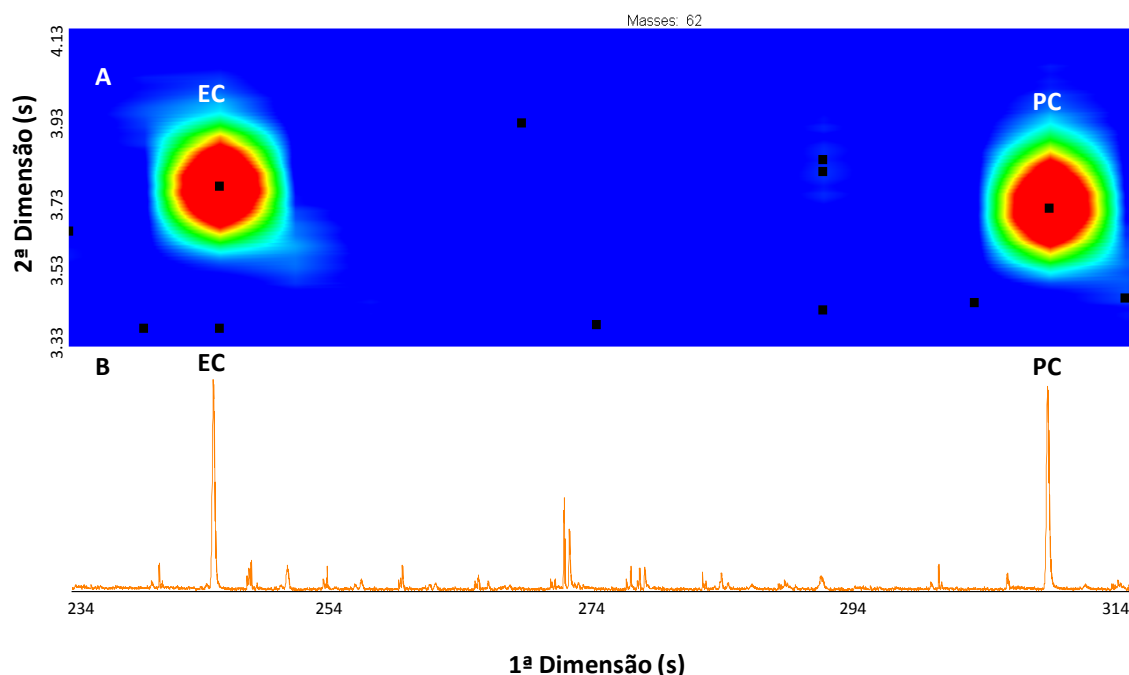


Figura 29 - Diagrama de contornos do GC \times GC (A) e respectivo cromatograma 1D em modo de extracção de ião m/z 62 (B), obtido com uma amostra de Vinho Bual (10 Anos), realçando a posição do carbamato de etilo (EC) e do carbamato de propilo (PC)

Na Figura 29 é possível visualizar-se um exemplo de um diagrama de contornos do GC \times GC (A) e respectivo cromatograma 1D em modo de extracção de ião m/z 62 (B), obtido para uma amostra de Vinho Bual (10 anos), evidenciando-se o pico do carbamato de etilo (EC) ($^1t_R = 246$; $^2t_R = 3,760$) e do PC ($^1t_R = 312$; $^2t_R = 3,700$). A Figura 29 ilustra uma boa resolução cromatográfica, sem interferência de picos de outros compostos presentes no vinho. O modo de extracção de ião aumenta a especificidade e sensibilidade da metodologia aplicada, permitindo uma minimização da contribuição dos compostos co-eluídos, aumentando a área do pico do composto alvo.

Capítulo III - Resultados e discussão

Com o intuito de quantificar o EC em vinhos Madeira, foi necessário efectuar curvas de calibração (Figura 30 e 31) com vinhos modelos doces e secos (simulação dos diferentes teores de açúcar em vinhos Madeira), onde se representou a razão das áreas entre o EC e o PC (A_{EC}/A_{PC}) em função da concentração de EC ($\mu\text{g/L}$). As áreas cromatográficas foram obtidas em modo de extracção de ião (m/z 62).

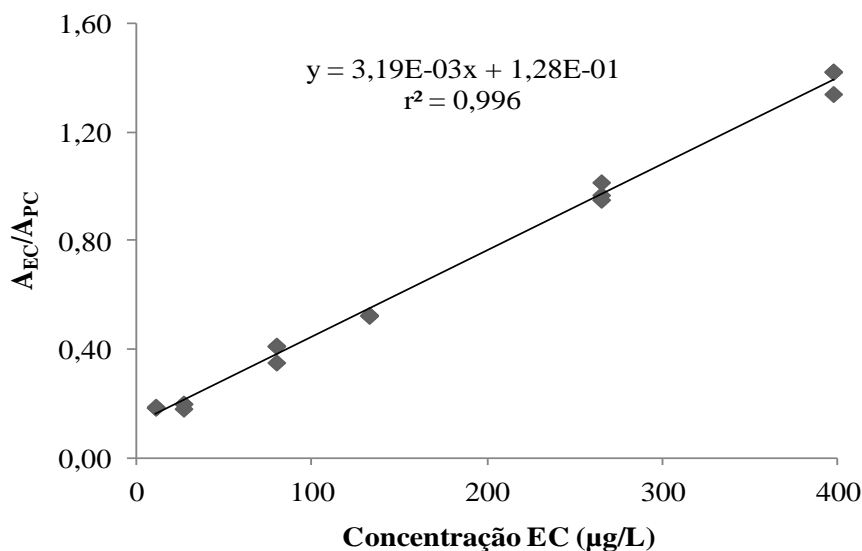


Figura 30 - Curva de calibração para vinhos modelos doces, em que se encontra representada a razão das áreas entre o carbamato de etilo (EC) e o carbamato de propilo (PC) em função da concentração de EC

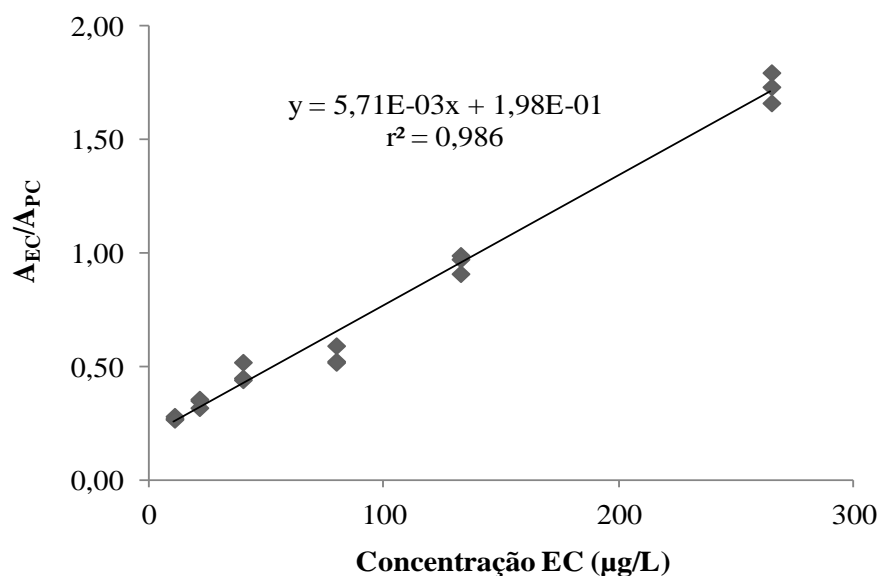


Figura 31 - Curva de calibração para vinhos modelos secos, em que se encontra representada a razão das áreas entre o carbamato de etilo (EC) e o carbamato de propilo (PC) em função da concentração de EC

Capítulo III - Resultados e discussão

Através das Figura 30 e 31, é possível verificar-se linearidade numa gama de concentração 10,6-265 µg/L (vinho seco/meio seco) e 10,6-398 µg/L (vinho doce/meio doce) entre a razão das áreas do EC e PC e a concentração de EC presente; obtendo-se bons coeficientes de correlação de 0,986 e de 0,996 para o vinho modelo seco/meio seco e doce/meio doce, respectivamente. Os valores do limite de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) foram calculados com base no desvio padrão das réplicas da solução padrão de menor concentração de EC, onde o LOD e o LOQ são 3 e 10 vezes o desvio padrão, respectivamente. É possível observar-se na Tabela 7 os vários parâmetros para validação da metodologia aplicada.

Tabela 7 – Parâmetros de validação para a metodologia HS-SPME/GC × GC-ToFMS na determinação do EC

Parâmetros	Vinho Modelo	
	Seco / Meio Seco	Doce / Meio Doce
Glucose (g/L)	56,5	115
Gama de concentração linear (µg/L)	10,6 – 265	10,6 – 398
Coeficiente de correlação (r^2)	0,986	0,996
Limite de detecção (µg/L)	3,52	1,54
Limite de quantificação (µg/L)	11,7	5,13
Repetibilidade (R.S.D. %)	7	3
	EC	PC
Índices de kovats (RI)	842	947
1t_R ; 2t_R (s)	246; 3,760	312; 3,700

Os valores de LOD e LOQ 3,52 e 11,7 µg/L (vinhos secos e meio secos) e 1,54 e 5,13 µg/L (vinhos doces e meio doces) respectivamente, são inferiores aos obtidos por Perestrelo *et al.* [62], 4,31 e 14,4 µg/L (vinhos secos e meio secos) e 2,75 e 9,16 µg/L (vinhos doces e meio doces). Esta diminuição dos valores de LOD e LOQ deve-se à introdução do padrão interno (PC), uma vez que este composto apresenta características semelhantes ao analito (EC), mas que pode ser quantificado separadamente. O PC foi sempre adicionado em todas as amostras com a mesma concentração, sendo que resposta obtida foi sempre a mesma. A concentração de EC foi então calculada com base na razão entre as áreas do EC e do PC, que são sujeitos às mesmas condições experimentais. A

Capítulo III - Resultados e discussão

introdução do PC permite uma diminuição da variabilidade dos resultados, e, consequentemente, diminuição da repetibilidade da metodologia aplicada.

A repetibilidade da metodologia foi determinada por seis extracções consecutivas da menor concentração de EC (10,6 µg/L) nos vinhos modelo secos/meio secos e doces/meio doces, expressa como R.S.D., tendo-se obtido 7 e 3 %, respectivamente. Para o vinho modelo doce/meio doce obteve-se uma repetibilidade inferior à obtida para vinhos seco/meio seco, bem como um valor superior de coeficiente de correlação. Estas evidências também haviam sido reportadas por Perestrelo *et al.* [62]. O teor de glucose superior em vinhos doces e meio doces pode explicar estes resultados, pois quanto maior for o teor de glucose, menor é a solubilidade do EC no vinho (matriz etanólica/aquosa), que consequentemente leva a um aumento da sua libertação para o espaço-cabeça. No entanto, de acordo com Robinson *et al.* [73], o aumento do teor de glucose deve ser controlado, uma vez que não pode ser comprometida a viscosidade da solução.

2 Avaliação do efeito de diferentes parâmetros na cinética de formação de EC em Vinhos Madeira e em vinhos modelo

2.1 Efeito das condições de armazenamento (luz, temperatura e tempo) em Vinhos Madeira

Neste estudo foi armazenado um vinho da casta Tinta Negra do tipo doce (2009) em diferentes condições: foram testadas 3 temperaturas (4 °C, temperatura ambiente – 25 °C e 40 °C) e a presença/ausência de luz.

Os resultados obtidos encontram-se na Figura 32. Observa-se que o teor de EC na amostra antes de ser armazenada era cerca de 26,0 µg/L; isto vai de encontro com a literatura que reporta a formação de EC durante a fermentação alcoólica em vinhos de mesa [42, 43] porque ocorre a metabolização da arginina que leva à formação de ureia, sendo que a ureia formada é posteriormente libertada para o mosto, reagindo com o etanol levando à produção de EC (Figura 19). Para além disso, o facto do vinho Madeira ser fortificado com álcool vínico, este poderá estar contaminado com EC (dado que bebidas destiladas têm teores elevados de EC) (parâmetro não controlado), podendo também contribuir para este teor inicial de EC na amostra testada.

Capítulo III - Resultados e discussão

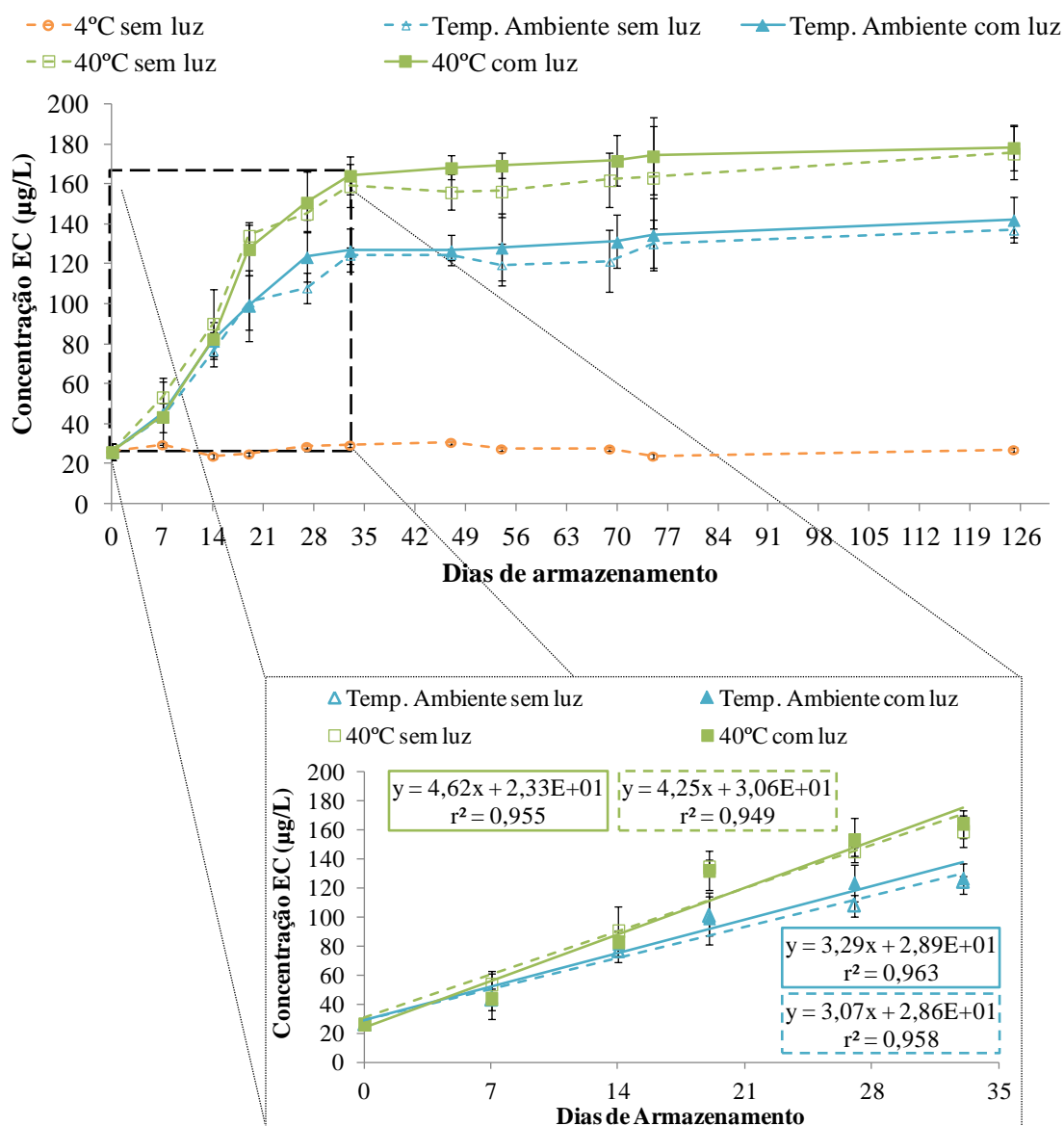


Figura 32 - Cinética de formação do carbamato de etilo (EC) em diferentes condições de armazenamento de um vinho da casta Tinta Negra do tipo doce (2009): temperatura de 4°C, ambiente e 40°C; presença ou ausência de luz

Pela Figura 32, também é possível verificar-se que aumento de temperatura leva a uma maior formação de EC no vinho armazenado. Este aumento de temperatura proporciona um aumento da energia cinética média das moléculas, provocando mais colisões, fazendo com que a velocidade da reacção aumente. É possível observar-se que após 16/17 dias, o vinho armazenado a 40 °C ultrapassa os limites internacionais (100 µg/L); para a temperatura ambiente são necessários cerca de 20 dias. No entanto, para a temperatura de 4 °C não se registaram alterações significativas no teor de EC ao longo do tempo de armazenamento estudado. O aumento do teor de EC proporcionado pelo aumento da temperatura já havia sido reportado na literatura para vinhos de mesa [43, 46, 47, 51], e

Capítulo III - Resultados e discussão

para vinhos fortificados [46, 51], sendo que no estudo de Kodama *et al.* [51] foi monitorizado o teor de EC de uma amostra de vinho Madeira. Steven e Ough [47] evidenciam que temperaturas inferiores a 24 °C são aconselháveis para armazenar vinhos de mesa. Assim, é de extrema importância que o armazenamento do vinho Madeira seja feito a temperaturas bastante baixas (4 °C) para evitar a formação do EC.

De notar que tanto para a temperatura ambiente, como para uma temperatura de 40 °C, se regista um aumento linear do teor de EC até ao 33º dia de armazenamento, estabilizando após esse período. Esta cinética de 1ª ordem observada já havia sido reportada por Hasnip *et al.* [46] para vinhos de mesa e fortificados. Uma cinética de 1ª ordem indica que a velocidade da reacção é proporcional à concentração dos precursores do EC, neste caso particular sabe-se que o principal precursor é a ureia. Quando ocorre a estabilização do teor de EC, provavelmente o que estará a ocorrer é que a ureia deixa de estar disponível e o EC deixa de ser produzido. No entanto será necessário efectuar mais estudos com intuito de avaliar o teor de ureia ao longo do processo de armazenamento. Os primeiros dias do armazenamento são, assim, fundamentais para a formação de EC nos vinhos Madeira.

Em relação ao efeito da presença/ausência de luz, apenas foi possível criar as condições necessárias para as temperaturas: ambiente e 40 °C. A luz não evidenciou um efeito significativo na cinética de formação do EC em vinhos Madeira, o mesmo já havia sido reportado por Tegmo-Larsson *et al.* [52] com vinhos de mesa e fortificados. A luz não mostrou ser um factor importante no engarrafamento e embalamento dos vinhos Madeira uma vez que a incidência directa de luz não demonstrou ser factor condicionante nos teores de EC. Desta forma os produtores/distribuidores de vinhos Madeira não necessitam de cuidados especiais.

2.2 Efeito do processo de estufagem em vinhos Madeira

Considerando o processo de vinificação do vinho Madeira, um dos pontos críticos na formação EC é o processo de estufagem [4, 50]. Com intuito de aferir o efeito da estufagem na formação do EC, foram analisados teores de EC de uma amostra de vinho da casta Tinta Negra do tipo seco e doce de 2010, antes e após o processo de estufagem (Figura 33). A estufagem decorreu durante 3 meses a uma temperatura de 45 ± 5 °C.

Capítulo III - Resultados e discussão

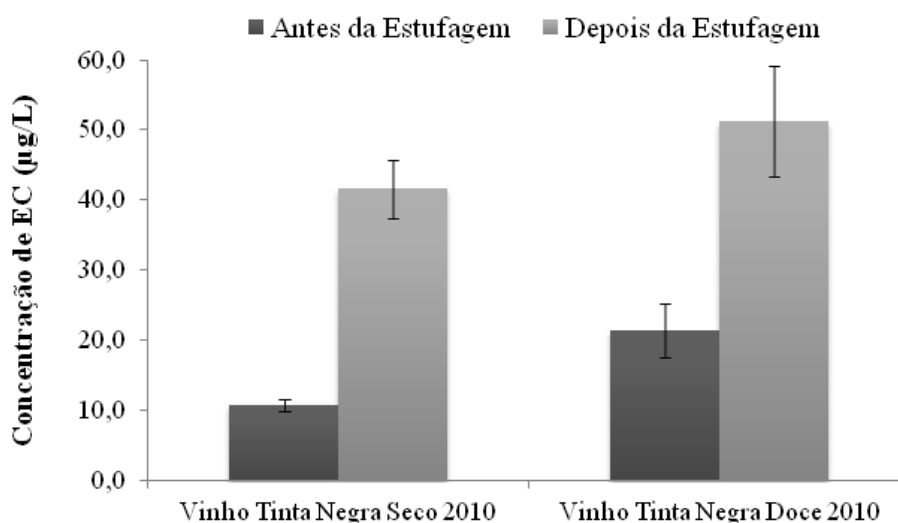


Figura 33 - Teores de carbamato de etilo (EC) de vinhos Madeira da casta Tinta Negra do tipo seco e doce, antes e após o processo de estufagem (3 meses a uma temperatura de 45 °C ± 5 °C)

É possível verificar-se pela Figura 33 que o processo de estufagem influencia os teores de EC nos vinhos Madeira, uma vez que há aumento da concentração de EC após o término do processo de estufagem quando comparado com o valor inicial (antes de se iniciar a estufagem). O aumento do teor de EC deve-se, entre vários factores, ao efeito da temperatura na cinética de formação do mesmo efeito, já explicado anteriormente. Observa-se que o valor de EC após a estufagem é similar para ambos os tipos de vinho, embora o aumento obtido para o vinho da casta Tinta Negra do tipo doce foi apenas 121 %, enquanto para o vinho da casta Tinta Negra do tipo seco o aumento foi de 288%. De notar que a concentração de EC no vinho da casta Tinta Negra do tipo doce antes da estufagem é bastante superior ao verificado para o vinho seco, isto poderá dever-se ao facto de após recepção das amostras no laboratório, estas terem sido mantidas à temperatura ambiente durante algum tempo e dado ser um vinho doce poderá ter-se potencializado a formação de EC (efeito do teor de glucose estudado em III.2.3 e III.2.4), daí que a diferença seja mais significativa para o vinho seco. Para além disso, existem outros factores externos que poderão estar a influenciar estes resultados, nomeadamente o álcool vínico que é adicionado, uma vez que este tipo de bebida costuma apresentar teores elevados de EC, podendo estar contaminado, e dessa forma influenciar os teores de EC no vinho [4]. No entanto, pode afirmar-se que o processo de estufagem tem impacto na formação do EC em vinhos Madeira.

Capítulo III - Resultados e discussão

2.3 Efeito do teor de glucose em vinhos modelo

Neste estudo foram armazenados 2 tipos de vinho modelo, com diferentes teores de glucose (57,0 e 115 g/L) a diferentes temperaturas (4 °C, temperatura ambiente e 40 °C).

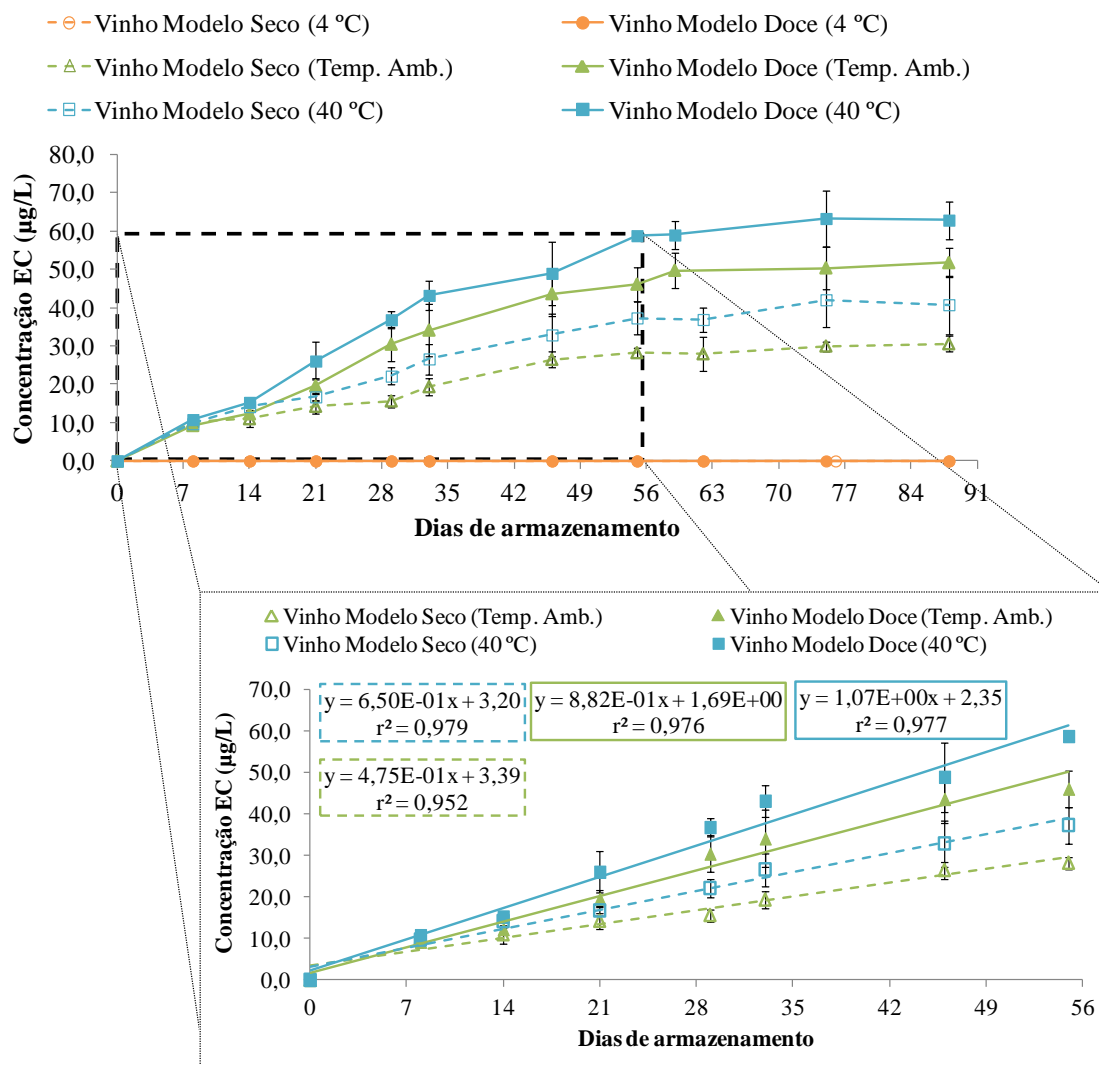


Figura 34 - Cinética de formação do carbamato de etilo (EC) em diferentes condições de armazenamento de vinhos modelo (doce e seco): temperatura de 4°C, ambiente e 40°C

É possível visualizar na Figura 34 a existência de uma proporcionalidade directa entre o aumento da temperatura e o teor do EC em vinhos modelo durante os primeiros 55 dias de armazenamento, quer à temperatura ambiente, quer a 40 °C, estabilizando após esse período (em qualquer uma das situações, o limite internacional não foi ultrapassado). Nos vinhos modelo armazenados a 4 °C, não se verificou a formação de EC dado que os valores obtidos foram inferiores ao LOQ da metodologia aplicada. A estabilização dos teores de EC ocorreu após 55 dias de armazenamento comparativamente com os 33 dias observados

Capítulo III - Resultados e discussão

no estudo prévio (secção III.2.2) onde se tinha armazenado uma amostra de vinho Madeira. Há uma diferença de 22 dias por duas razões: uma prende-se com a complexidade da amostra de vinho e o sistema completamente controlado de um vinho modelo (diferentes tipos de amostra); o outro motivo prende-se com o teor inicial de EC, note-se que no estudo prévio (secção III.2.2) o teor inicial era de 26,0 $\mu\text{g/L}$ comparativamente aos valores <LOQ neste estudo. Desta forma seria de prever a necessidade de tempos de reacção mais longos para a estabilização dos teores de EC, tal como se registou. Para além disso, desconhece-se os teores de ureia presentes no vinho, de tal forma que a cinética também é influenciada por este valor. Este estudo demonstra novamente a importância da temperatura no armazenamento dos vinhos Madeira relativamente à formação do EC, salientando-se a temperatura de 4 °C para esse efeito.

Afere-se, ainda, que o aumento de EC é mais acentuado para os vinhos modelo doces do que para os secos; estes dados evidenciam o papel da glucose na cinética de formação do EC, pois quanto maior é o teor de glucose (115 $\mu\text{g/L}$), maior é a quantidade de EC formado. No entanto, este estudo não nos permite saber exactamente de que forma é que a glucose actua na reacção.

2.4 Efeito do tipo de açúcar em vinhos modelo

Atendendo aos resultados obtidos no estudo da secção III.2.3, houve a necessidade em compreender de que forma a molécula de glucose intervém na formação do EC. Neste estudo foram preparados 2 tipos de vinho modelo, um com sorbitol e outro com glucose (mesmo teor), sendo estes armazenados a uma temperatura de 40 °C. Estes açúcares são estruturalmente semelhantes à excepção de um grupo carbonilo (Figura 35).

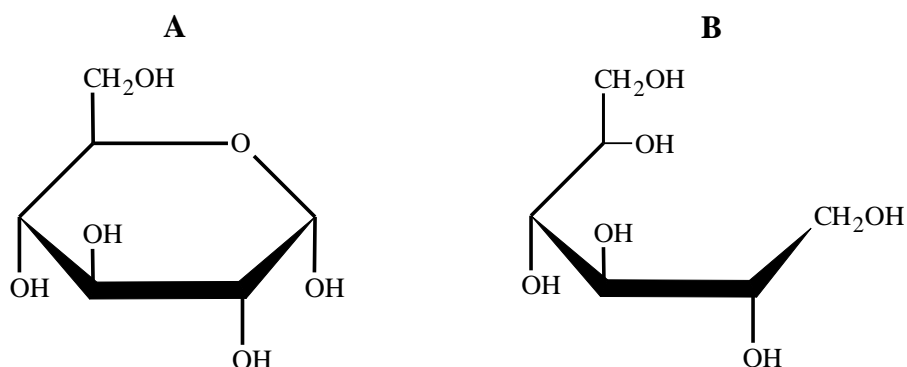


Figura 35 - Representação da estrutura da glucose (A) e do sorbitol (B)

Capítulo III - Resultados e discussão

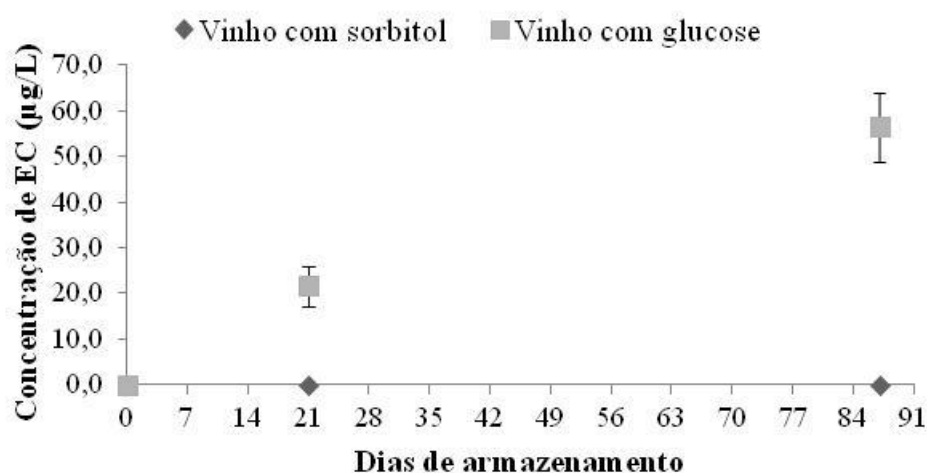


Figura 36 - Teores de carbamato de etilo (EC) em vinhos modelo com sorbitol e glucose

É possível observar-se através da Figura 36, que o teor de EC nos vinhos modelo com sorbitol foi inferior ao LOQ da metodologia aplicada. Já para o vinho modelo com glucose, verifica-se um aumento do teor de EC com o tempo de armazenamento. Estes resultados evidenciam o papel da glucose na cinética de formação do EC, com especial atenção para o grupo carbonilo da mesma.

Para compreender a influência do grupo carbonilo na reacção, foram efectuados os mecanismos das reacções entre a ureia e a glucose ou sorbitol [77].

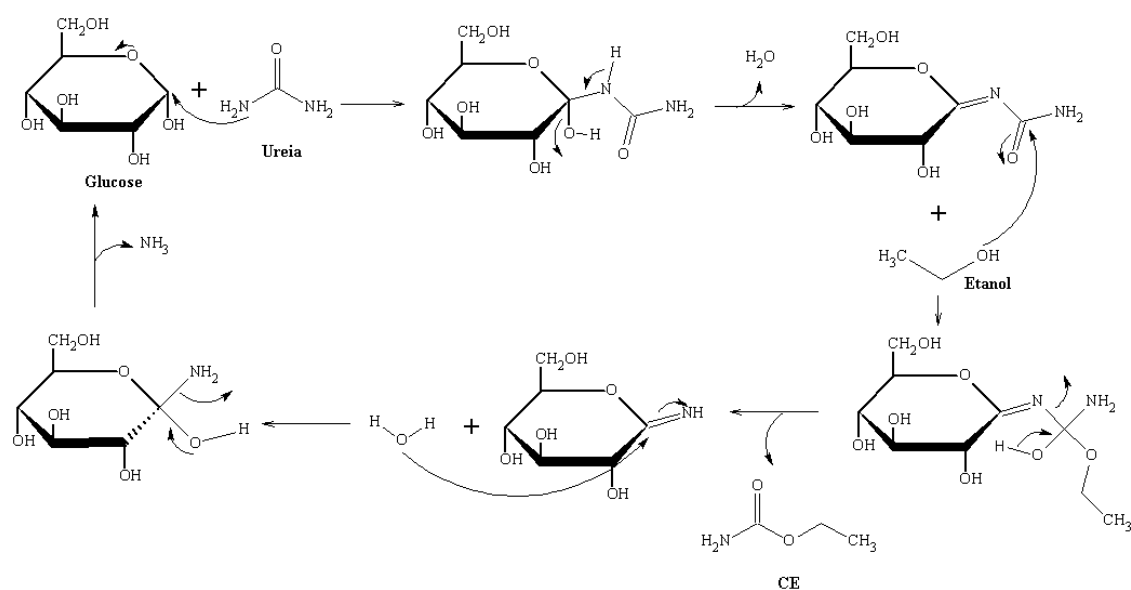


Figura 37 - Mecanismo de reacção entre a glucose e a ureia, em meio ácido

Capítulo III - Resultados e discussão

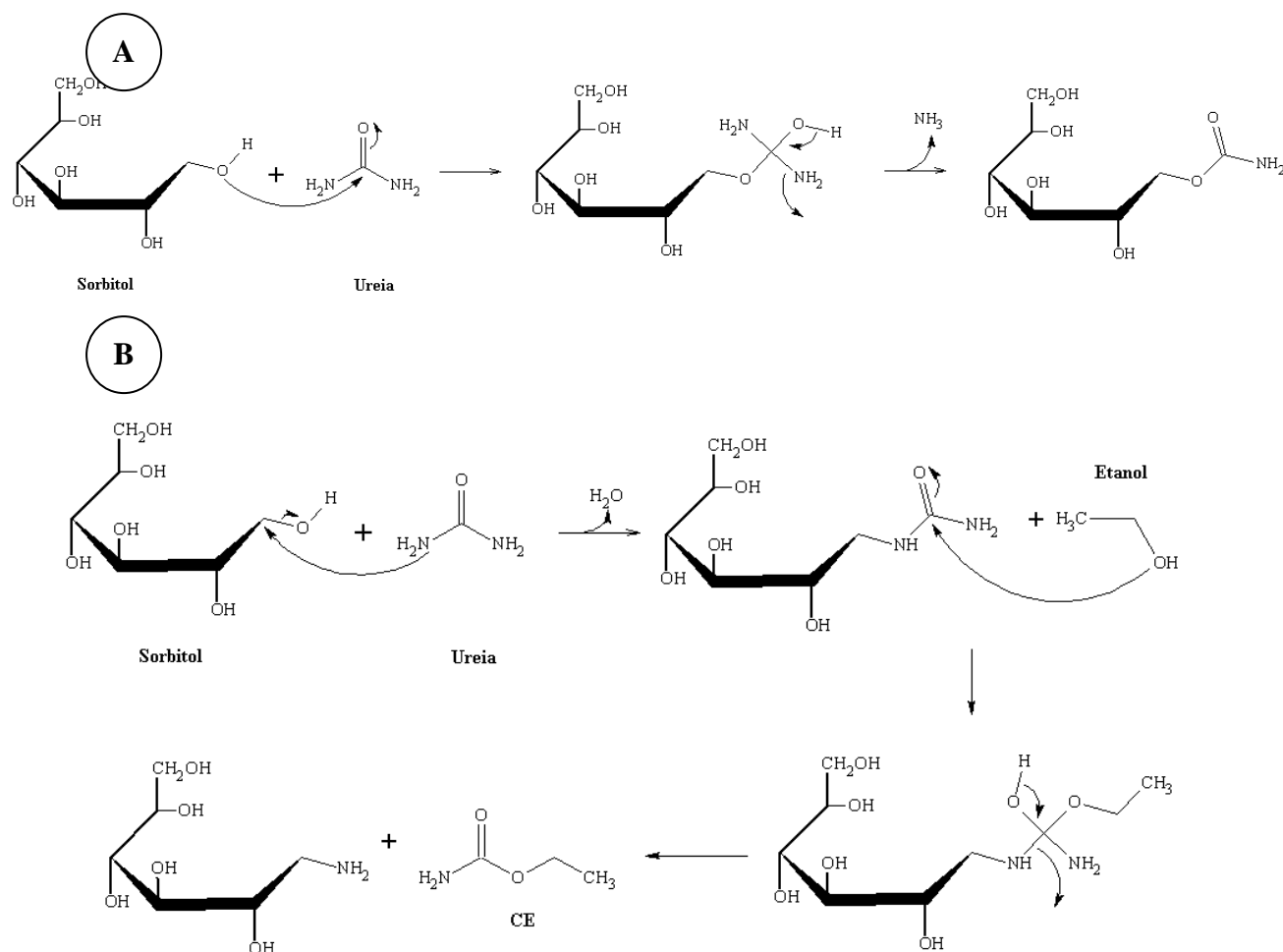


Figura 38 - Mecanismos de reacção (A e B) entre o sorbitol e a ureia, em meio ácido

Como é possível verificar-se pela Figura 37, a reacção entre a glucose e a ureia permite a formação de EC, sendo que no final da reacção a glucose é recuperada. Pode dizer-se que a glucose é uma molécula catalisadora da reacção, ou seja, ela proporciona a formação de EC, sendo que no final da reacção pode ser re-utilizada novamente, uma vez que não é consumida. É expectável que vinhos com teores mais elevados de açúcar tenham maiores teores de EC, pois para além da reacção da ureia com o etanol (Figura 19), esta reage também com a glucose. Estes dados vão de encontro aos resultados obtidos no estudo C (secção 4.2.3) onde se verificou que os vinhos modelo doces têm teores de EC superiores aos vinhos modelo secos.

No caso da reacção da ureia com o sorbitol afere-se a possibilidade de ocorrência de 2 reacções (Figura 38): em A, ocorre a ligação entre a ureia e o sorbitol, inutilizando ambas as moléculas para futuras reacções, desta forma, a ureia deixa de estar disponível para reagir com o etanol, não se proporcionando a formação do EC; em B, ocorre a

Capítulo III - Resultados e discussão

formação de EC, no entanto, no final da reacção, não há recuperação da molécula de sorbitol.

Para se saber qual das reacções é mais favorável, em termos energéticos, foi necessário recorrer às entalpias padrão de reacção. A entalpia padrão de uma reacção é a entalpia da reacção quando os reagentes, nos seus estados padrão, transformam-se em produtos, nos seus estados padrão. A fórmula de cálculo mais comum da entalpia padrão de uma reacção (ΔH_R°) é:

$$\Delta H_R^\circ = \sum n\Delta H_f^\circ(\text{produtos}) - \sum n\Delta H_f^\circ(\text{reagentes}) \text{ (eq. 1)}$$

em que ΔH_f° refere-se a entalpia padrão de formação, n representa os coeficientes estequiométricos da equação química e \sum significa o somatório. Dado não existir informação suficiente sobre as entalpias padrão de formação de todos os compostos envolvidos nas reacções descritas nas Figura 37 e 38, foi adoptada outra estratégia para o cálculo da entalpia padrão da reacção. O cálculo da entalpia padrão de reacção foi efectuado com recurso às variações de entalpia que acompanham a quebra e formação de ligações:

$$\Delta H_R^\circ = \sum \text{Energia das ligações quebradas} - \sum \text{Energia das ligações formadas} \text{ (eq. 2) [78]}$$

Com recurso à expressão matemática anterior (eq. 2), foi efectuado o cálculo das entalpias das reacções entre a glucose e a ureia, e as duas reacções entre o sorbitol e a ureia. Para a reacção entre a glucose e a ureia obteve-se um $\Delta H_R^\circ = 20 \text{ kJ/mol}$; para a reacção A (entre sorbitol e ureia) o valor obtido foi de $\Delta H_R^\circ = 20 \text{ kJ/mol}$, enquanto que para a reacção B o ΔH_R° foi de 0 kJ/mol . Quando se obtém $\Delta H_R^\circ > 0$, significa que a reacção é endotérmica, não espontânea, o que implica que é necessária energia externa para que a reacção ocorra (p.e. aumento de temperatura do sistema). Quando o $\Delta H_R^\circ = 0$, significa que a reacção está em equilíbrio. Assim, a reacção da Figura 38A pode ocorrer se existir energia externa (temperatura de 40°C) em detrimento da reacção da Figura 38B que energeticamente não ocorre, logo não se forma EC. Assim confirma-se os resultados experimentais, nos quais os teores de EC foram inferiores ao LOQ na reacção com sorbitol.

O valor da entalpia de reacção entre a glucose e a ureia ($\Delta H_R^\circ > 0$) vem confirmar os resultados obtidos na secção II.2.1 e II.2.3 para a temperatura de 4°C . Dado que a reacção não é espontânea e não é fornecida energia externa suficiente (o armazenamento decorre a 4°C), a reacção não ocorre o que faz com que os teores de EC não variem quando os vinhos são armazenados a esta temperatura.

Capítulo III - Resultados e discussão

3 Análise do efeito da casta, tipo de vinho e idade no teor de EC em vinhos Madeira

Com recurso às curvas de calibração definidas na secção III.1, foram determinados os teores de EC em vinhos Madeira (Tabela 8). Com este estudo pretende-se avaliar o efeito da casta, tipo de vinho e da idade dos mesmos, no teor de EC.

Tabela 8 - Teores de EC (g/L) das amostras de Vinho Madeira

Produtor	Casta	Tipo de vinho	Blend (anos)	Indicação Idade (anos)	[EC] (µg/L)	RSD (%)
A	Bual	Meio Doce	-	2005 (6)	147	3
			10	-	136	15
			-	1995 (16)	90,4	4
			15	-	38,2	10
	Malvasia	Doce	-	2009 (2)	134	5
			10	-	94,0	9
			-	1998 (13)	142	6
			15	-	137	19
			>40	-	147	3
			-	2005 (6)	11,0	18
			10	-	14,1	9
			-	1995 (16)	29,5	17
	Sercial	Seco	15	-	61,5	17
			-	1979 (32)	104	12
			10	-	42,8	15
			-	1995 (16)	23,5	19
			15	-	46,0	9
			20	-	67,3	3
	Verdelho	Meio Seco	-	2009 (2)	93,5	6
			3	-	77,1	11
			-	2006 (5)	74,8	18
B	Sercial	Seco	-	2009 (2)	<LOQ	
	Tinta Negra	Seco	-	2010 (1)	10,7	8
			-	2009 (2)	19,9	15
		Doce	-	2010 (1)	21,4	18
			-	2009 (2)	26,0	15
	Bual	Meio Doce	-	-	58,5	11
			-	-	84,9	13
			-	-	116,1	6
			-	-	253	1
			-	-	89,3	12

Capítulo III - Resultados e discussão

Verifica-se pela Tabela 8 que os teores de EC nas amostras analisadas de vinho Madeira variaram entre <LOQ e os 253 µg/L, sendo que em 9 amostras (29 %) foi detectado um teor de EC superior ao limite internacional estabelecido pelo Canadá (100 µg/L).

As castas em que se observaram teores mais elevados de EC foram a Malvasia e Bual, que são vinhos do tipo doce e meio doce, respectivamente. Já para as castas Sercial e Verdelho, vinhos do tipo seco e meio seco respectivamente, os teores de EC determinado nas amostras foram sempre inferiores ao limite internacional à excepção do vinho Sercial 32 anos (1979) que apresenta um teor de EC de 104 µg/L. Estes teores vão de encontro aos resultados obtidos nos estudos prévios (secção III.2.3 e III.2.4), uma vez que a glucose é uma molécula catalisadora da reacção. Dado que a casta está intimamente ligada ao tipo de vinho produzido, estes estudos vêm indicar a importância de se dar especial atenção a vinhos com elevados teores de glucose, uma vez que esta catalisa a reacção, proporcionando a formação de EC.

Para além do tipo de casta estar relacionado com tipo de vinho, o mesmo acontece com a quantidade de precursores existentes. De acordo com Pereira *et al.* (2008) [40], os teores de arginina variam consoante a casta utilizada. Assim poderá ocorrer um efeito sinérgico entre a quantidade de precursores existentes e o tipo de vinho, proporcionando-se, assim, que vinhos com elevado teor de glucose e/ou arginina tenham maior tendência para a formação de EC.

Foram efectuadas diversas tentativas de correlação entre a idade dos vinhos com o teor de EC presente nos mesmos, no entanto não se encontrou nenhuma correlação directa entre estes dois parâmetros. As razões para este facto são várias: o número de amostras foi reduzido, uma vez que teve de se excluir os vinhos *blended* (vinhos com idade aparente) e as amostras Bual do produtor B (não se dispunha de informação da idade dos mesmos); para além disso, como se verificou anteriormente, a quantidade de precursores e de glucose, consoante o tipo de casta e consequentemente o tipo de vinho, têm influência directa na formação do EC; as condições do processo de vinificação, e até o ano da colheita, também podem ter influência. Há assim uma variabilidade de factores condicionantes que limitam a obtenção de uma correlação entre os teores de EC consoante a idade do vinho.

Capítulo III - Resultados e discussão

Entre produtores, também não foi possível fazer-se uma comparação global, dado que o número de amostras é significativamente diferente entre ambos e para metade das amostras do produtor B apenas foi fornecida a informação sobre a casta a partir da qual foram produzidos os vinhos. Apenas se verifica para a casta Tinta Negra, e nomeadamente o tipo de vinho doce do ano 2009, que os teores de EC obtidos para os vinhos do produtor A foram bastante elevados (93,5 µg/L) comparativamente aos obtidos para os vinhos do produtor B (26,0 µg/L). Estes valores díspares podem significar processos de vinificação diferentes, bem como diferentes cuidados que poderão proporcionar a formação de EC nos vinhos.

4 Determinação da acidez total e volátil de vinho Madeira

Primeiramente foi feita a determinação da acidez total (g/L) das amostras de vinho Madeira fornecidas por dois produtores diferentes, que se encontram presentes na Tabela 9.

É possível observar-se pela Tabela 9 que a acidez total das amostras varia entre 5,25 e 10,5 g/L expressa em ácido tartárico. Os valores de acidez total obtidos foram similares aos reportados por Câmara *et al.* [20] (2006) que analisou vinhos Madeira com 1, 11 e 25 anos das castas Bual, Malvasia, Sercial e Verdelho, e registou uma acidez total entre 5,09 e 10,7 g/L.

Foi feita uma tentativa de tratamento estatístico, no qual se conseguiu obter uma correlação entre a idade do vinho utilizado e a acidez total do mesmo (Figura 39).

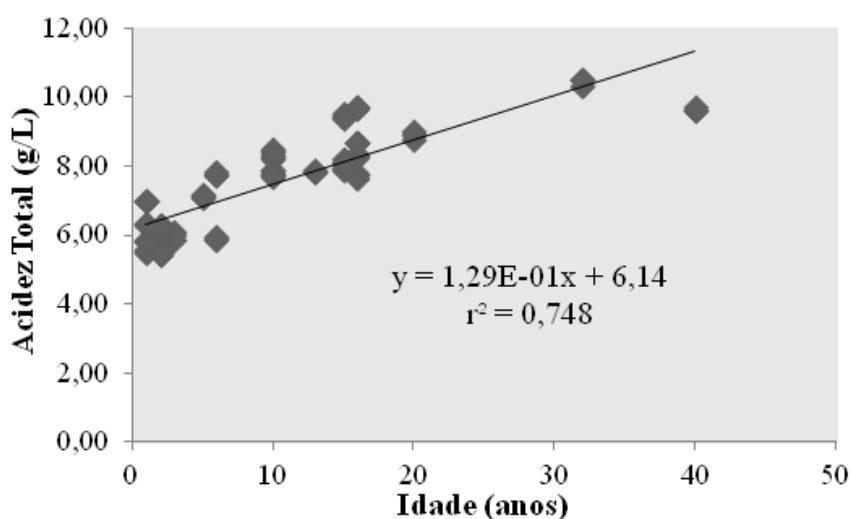


Figura 39 - Acidez total (g/L) das amostras de vinho Madeira em função da idade (anos)

Capítulo III - Resultados e discussão

Tabela 9 - Acidez total (g/L) das amostras de vinho Madeira

Produtor	Casta	Tipo de vinho	Blend (anos)	Indicação Idade (anos)	Acidez total (g/L) ⁸
A	Bual	Meio Doce	-	2005 (6)	5,89
			10	-	8,25
			-	1995 (16)	7,74
			15	-	8,29
	Malvasia	Doce	-	2009 (2)	6,29
			10	-	8,44
			-	1998 (13)	7,85
			15	-	9,45
			>40	-	9,66
	Sercial	Seco	-	2005 (6)	7,76
			10	-	7,80
			-	1995 (16)	9,70
			15	-	8,13
			-	1979 (32)	10,5
	Verdelho	Meio Seco	10	-	7,76
			-	1995 (16)	7,93
			15	-	8,70
			20	-	8,90
B	Tinta Negra	Doce	-	2009 (2)	5,58
			3	-	5,98
			-	2006 (5)	7,14
	Sercial	Seco	-	2009 (2)	5,45
	Tinta Negra	Seco	-	2010 (1)	7,00
			-	2009 (2)	6,23
		Doce	-	2010 (1)	5,83
			-	2009 (2)	6,01
	Bual	Meio Doce	-	-	5,25
			-	-	6,26
			-	-	7,00
			-	-	7,66
			-	-	7,49
			-	-	7,49

⁸ R.S.D. < 5 %

Capítulo III - Resultados e discussão

Fazendo uma representação gráfica da acidez total em função da idade (anos), é possível verificar-se uma relação linear (Figura 39) entre os dois parâmetros, com um r^2 de 0,748; apenas se excluiu os vinhos da casta Bual do produtor B, por não se ter informação sobre a idade dos mesmos. Apesar de existir imensa variabilidade nos dados, quer seja tipo de casta, como na existência de vinhos *blended* conseguiu-se encontrar uma correlação. Esta evidência já havia sido reportada em Câmara *et al.* [20] (2006) em que a acidez total aumenta com o envelhecimento dos vinhos, no entanto a quantidade de amostras era bastante reduzida (apenas 3).

Este aumento de acidez dos vinhos Madeira leva a um problema de estabilidade dos vinhos que se pretende ser solucionado. Para tal, recorrendo a uma técnica de elevada sensibilidade (GC \times GC-ToFMS) analisou-se a composição em ácidos orgânicos voláteis das amostras de vinhos Madeira com intuito de saber os que são passíveis de estar a contribuir para este aumento de acidez. Para se identificar os ácidos orgânicos voláteis presentes nas amostras, foi necessário calcular os índices de Kovats correspondentes (RI) com base na expressão matemática descrita no material e métodos (secção II.3.3), recorrendo a uma série de alcanos ($C_8 - C_{20}$). De seguida, foi feita a comparação destes RI calculados com os RI reportados na literatura, primeiramente com o 1D GC e depois para GC \times GC (em ambas as situações foi tida em conta a similaridade entre as colunas dos equipamentos). Considerou-se uma identificação correcta dos compostos quando a diferença de R_i s foi inferior a 5%. Assim, foi possível identificar 18 ácidos orgânicos voláteis, dos quais 4 destes nunca haviam sido reportados em vinhos Madeira (Tabela 10).

Capítulo III - Resultados e discussão

Tabela 10 - Identificação dos ácidos orgânicos voláteis presentes nas amostras de vinhos Madeira e respectivo descritor de aroma

1t_R (s)	2t_R (s)	R.I. Calc. ^a	R.I. Lit. ^b	R.I. Lit. ^c	Ácidos orgânicos voláteis	Composto previamente identificado em Vinhos Madeira	Descritor de aroma [10, 79-82]
96	3,20	617	600	610	Ácido acético	[10, 17-19, 21, 22]	vinagre, pungente, azedo
126	4,13	674	668	-	Ácido propanóico	[10, 20, 21]	pungente, ranço, queijo, vinagre
156	3,89	729	793	755	Ácido 2-metilpropanóico	[17, 21]	queijo, gordura
174	4,66	764	821	798	Ácido butanóico	[18-22]	queijo, manteiga com nuance a fruta
216	4,18	841	834	839	Ácido 3-metilbutanóico	[17, 19, 20]	ranço, queijo, frutado, azedo, pungente
222	3,98	852	873	864	Ácido 2-metilbutanóico	[21]	queijo, frutado
228	3,22	862	879	-	Acido pentanóico	-	queijo, frutado
336	3,98	986	1019	973	Ácido hexanóico	[10, 17-22]	pungente, queijo, ranço
420	3,52	1072	1083	-	Acido heptanóico	-	queijo, frutado
462	2,67	1117	1129	1132	Ácido 2-etilhexanóico	[19]	-
504	3,11	1167	1179	1194	Ácido octanóico	[18-22]	gordura, madeira, ranço
588	2,68	1286	1280	1277	Ácido nonanóico	[19]	madeira, queijo
666	2,44	1371	1380	-	Ácido decanóico	[10, 19-21]	azedo, gordura, citrino, ranço
810	2,04	1553	1559	-	Ácido dodecanóico	[19, 21]	coco, gordura
942	1,80	1753	1761	-	Ácido tetradecanóico	[19, 22]	gordura, madeira, coco
1002	1,71	1853	1851	-	Acido pentadecanóico	-	madeira
1062	1,65	1953	1953	-	Acido hexadecanóico	[22]	gordura, madeira
1170	1,64	2138	2144	-	Ácido 9-octadecenóico	-	gordura, madeira

Legenda:

^a RI: Índice de Kovats obtido através do cromatograma modulado

^bRI: Índice de Kovats reportado na literatura para 1D GC com uma coluna GC 5 % -fenil-metilpolisiloxana ou equivalente [83-93]

^c RI: Índice de Kovats reportado na literatura para sistemas GC × GC com uma coluna de 1ª dimensão HP-5 ou equivalente [94-96]

De seguida, na Figura 40 é possível observar-se um exemplo de um diagrama de contornos em modo de iões totais (TIC) do GC × GC, obtido com uma amostra de vinho Madeira (Sercial 15 anos) onde se encontra o perfil volátil com destaque para os ácidos orgânicos voláteis identificados.

Capítulo III - Resultados e discussão

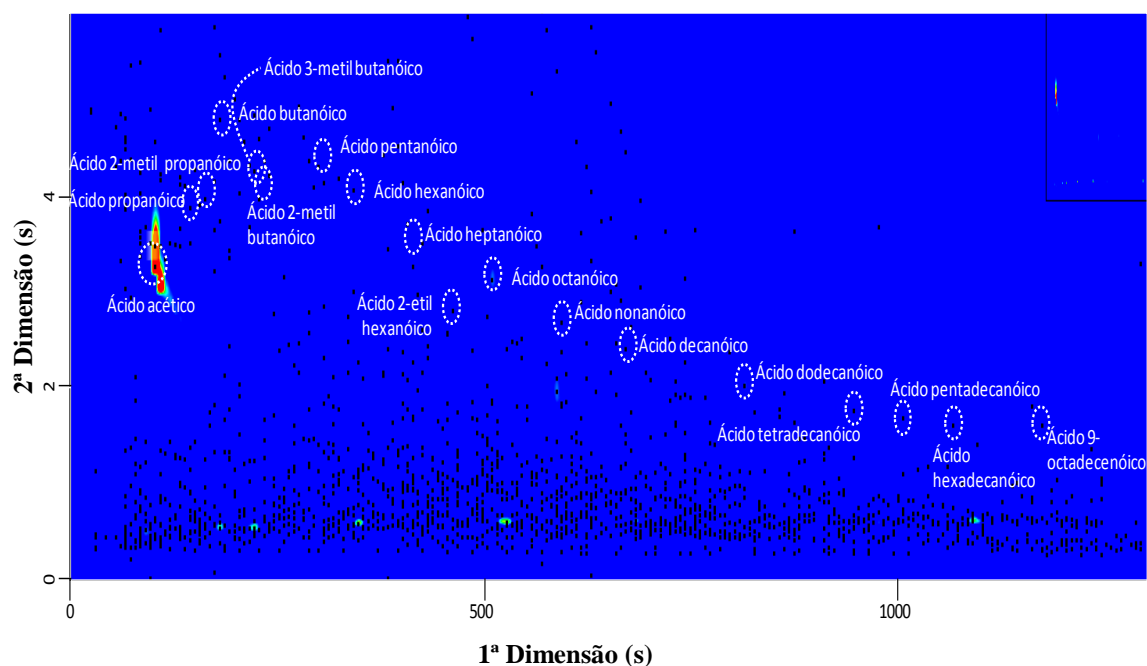


Figura 40 - Diagrama de contornos em modo de iões totais (TIC) do GC \times GC, obtido com uma amostra de vinho Sercial (15 anos), onde se encontram o perfil da acidez volátil, evidenciando os ácidos presentes

Ao analisar-se a Figura 40, verifica-se que à medida que o número de carbonos aumenta (aumento da massa molecular), menor é a volatilidade e maior o tempo de retenção na 1ª dimensão. Relativamente ao tempo de retenção da 2ª dimensão, há uma diminuição da polaridade dos compostos, uma vez que há um aumento da cadeia carbonada dos mesmos.

De seguida, nas Tabela 11 e 12 é possível observar-se as áreas dos picos dos ácidos orgânicos voláteis presentes nas amostras de vinho Madeira, obtidas pelos cromatogramas GC \times GC e respectivo RSD.

Capítulo III - Resultados e discussão

Tabela 11 – Ácidos voláteis identificados por HS-SPME/GC × GC-ToFMS em vinhos Madeira secos (Sercial e Tinta Negra) e meio secos (Verdelho e Tinta Negra)

Ácidos Orgânicos Voláteis	Vinho Seco										Vinho Meio Seco			
	Tinta Negra			Sercial							Verdelho			
	1* (AE ^a)	1 (DE ^b)	2	2	6	10 (b)	15 (b)	16	32		10 (b)	15 (b)	16	20
	Área cromatográfica (x10 ⁶) ^c (RSD %) ^d													
Ácido acético	15,81 (11)	26,23 (19)	41,91 (17)	58,80 (8)	57,76 (14)	50,60 (3)	49,86 (18)	54,29 (11)	1,40 (16)	42,86 (19)	40,34 (10)	91,58 (12)	52,51 (12)	
Ácido propanóico	0,16 (19)	0,31 (19)	0,26 (5)	0,31 (11)	1,05 (13)	0,26 (15)	1,39 (20)	- -	1,09 (20)	0,37 (8)	0,63 (17)	0,48 (19)	0,68 (1)	
Ácido 2-metilpropanóico	1,17 (15)	1,14 (11)	2,05 (2)	1,08 (7)	1,26 (19)	0,86 (19)	2,52 (10)	2,82 (13)	5,90 (3)	0,59 (7)	0,76 (18)	0,55 (19)	1,16 (4)	
Ácido butanóico	0,59 (14)	0,42 (18)	1,76 (11)	0,40 (12)	0,93 (3)	1,87 (20)	4,06 (16)	1,84 (20)	2,16 (17)	0,79 (14)	1,99 (15)	0,37 (17)	0,78 (2)	
Ácido 3-metilbutanóico	0,54 (14)	0,86 (17)	0,75 (5)	0,66 (13)	3,29 (10)	2,25 (9)	5,09 (21)	2,83 (19)	3,74 (13)	0,87 (13)	1,68 (18)	0,86 (9)	2,05 (6)	
Ácido 2-metilbutanóico	0,68 (16)	- -	1,35 (3)	0,70 (21)	- -	0,64 (18)	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -
Ácido pentanóico	- -	- -	0,02 (22)	- -	- -	- -	- -	- -	- -	0,02 (17)	0,05 (18)	- -	- -	- -
Ácido hexanóico	8,57 (5)	3,88 (13)	5,27 (6)	3,79 (12)	0,65 (14)	1,27 (11)	2,16 (17)	1,81 (19)	1,44 (19)	0,84 (15)	1,70 (13)	0,92 (12)	1,41 (21)	
Ácido heptanóico	0,03 (15)	- -	0,04 (19)	0,09 (6)	0,04 (16)	- -	0,13 (20)	0,08 (15)	0,05 (9)	- -	0,05 (14)	- -	- -	- -
Ácido 2-etilhexanóico	0,20 (18)	- -	0,14 (17)	0,29 (9)	0,03 (5)	0,12 (10)	0,15 (15)	- -	- -	0,27 (11)	0,07 (2)	- -	- -	- -
Ácido octanóico	27,68 (6)	13,17 (14)	16,20 (8)	9,70 (4)	0,85 (12)	1,32 (15)	2,22 (16)	2,47 (22)	1,45 (5)	0,77 (1)	1,75 (14)	2,08 (19)	2,30 (15)	
Ácido nonanóico	0,21 (18)	0,13 (19)	0,27 (13)	0,35 (19)	0,13 (2)	0,36 (12)	0,57 (11)	0,36 (19)	0,16 (10)	0,03 (15)	0,25 (15)	0,07 (11)	0,14 (18)	
Ácido decanóico	9,43 (15)	4,36 (17)	4,60 (12)	1,84 (14)	0,38 (18)	0,21 (12)	1,06 (6)	0,36 (17)	0,38 (12)	0,20 (16)	0,51 (16)	0,79 (20)	0,80 (19)	
Ácido dodecanóico	0,45 (16)	3,61 (19)	0,14 (19)	0,28 (12)	0,53 (17)	0,36 (17)	0,33 (14)	0,38 (17)	0,51 (5)	0,57 (6)	1,54 (9)	2,40 (19)	1,51 (19)	
Ácido tetradecanóico	1,09 (14)	1,86 (14)	0,15 (18)	0,33 (12)	0,35 (8)	0,53 (8)	4,49 (15)	0,75 (19)	1,29 (12)	0,30 (16)	0,68 (8)	2,29 (13)	0,52 (17)	
Ácido pentadecanóico	0,51 (14)	0,31 (2)	0,22 (17)	0,14 (17)	0,05 (16)	0,19 (13)	0,42 (11)	0,24 (10)	0,45 (17)	- -	0,26 (18)	0,12 (16)	0,05 (17)	
Ácido hexadecanóico	3,12 (18)	1,12 (9)	1,58 (19)	0,74 (16)	0,52 (7)	1,14 (10)	3,85 (18)	1,52 (9)	1,43 (14)	0,26 (12)	0,77 (16)	0,50 (17)	0,38 (16)	
Ácido 9-octadecenoico	0,27 (10)	0,06 (3)	- -	0,03 (12)	0,03 (1)	- -	0,51 (20)	0,66 (19)	0,11 (19)	- -	0,06 (19)	0,04 (12)	- -	- -
Total Áreas	71,09 (2)	57,47 (19)	76,72 (8)	79,53 (6)	67,85 (7)	62,00 (1)	78,81 (4)	69,82 (21)	21,55 (11)	57,42 (23)	53,10 (16)	103,07 (10)	64,29 (9)	

Legenda:

*Idade do vinho

^b Após estufagem

^d Desvio padrão relativo, expresso em percentagem

^a Antes da estufagem

^c Média de três réplicas

(b) *blended*

Capítulo III - Resultados e discussão

Tabela 12 - Ácidos voláteis identificados por HS-SPME/GC × GC-ToFMS em vinhos Madeira doces (Tinta Negra e Malvasia) e meio doces (Bual)

Ácidos Orgânicos Voláteis	Vinho Doce											Vinho Meio Doce			
	Tinta Negra						Malvasia					Bual			
	1 (AE ^a)	1 (DE ^b)	2 (B)	2 (A)	3 (b)	5	2	10 (b)	13	15 (b)	>40 (b)	6	10 (b)	15 (b)	16
	Área cromatográfica (x10 ⁶) ^c (RSD %) ^d														
Ácido acético	41,77 (19)	14,75 (20)	23,67 (16)	17,07 (20)	70,09 (19)	52,46 (3)	21,62 (17)	35,99 (14)	45,64 (19)	33,89 (13)	37,34 (17)	41,23 (5)	43,38 (17)	55,42 (19)	53,07 (11)
Ácido propanóico	0,22 (17)	0,25 (5)	0,36 (10)	- -	0,38 (16)	0,94 (3)	0,35 (17)	1,60 (19)	1,26 (19)	0,33 (19)	0,60 (18)	0,31 (10)	1,44 (13)	0,27 (19)	0,21 (19)
Ácido 2-metilpropanóico	1,13 (19)	0,80 (14)	0,34 (6)	- -	0,24 (14)	0,15 (18)	0,22 (15)	0,38 (20)	0,72 (16)	0,49 (11)	0,80 (15)	0,60 (10)	1,97 (9)	0,74 (7)	0,47 (17)
Ácido butanóico	0,45 (17)	0,11 (3)	0,22 (6)	0,06 (13)	0,47 (7)	0,27 (8)	2,50 (13)	2,41 (11)	2,52 (18)	2,91 (16)	4,56 (13)	0,60 (19)	1,79 (19)	0,69 (11)	0,48 (16)
Ácido 3-metilbutanóico	0,40 (18)	0,44 (8)	- -	0,33 (18)	0,16 (14)	0,48 (20)	0,27 (9)	0,58 (19)	1,88 (1)	2,61 (17)	3,16 (12)	0,34 (10)	2,36 (14)	0,48 (7)	0,48 (7)
Ácido 2-metilbutanóico	0,39 (22)	- -	- -	- -	- -	- -	- -	0,39 (11)	6,36 (11)	0,48 (9)	0,40 (18)	0,38 (9)	0,65 (8)	0,40 (13)	0,35 (16)
Acido pentanóico	- -	- -	- -	- -	0,01 (11)	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	0,08 (19)	- -	- -
Ácido hexanóico	2,34 (11)	0,77 (15)	1,50 (14)	0,13 (17)	0,16 (21)	0,37 (7)	0,44 (11)	1,57 (17)	1,44 (12)	1,36 (4)	1,54 (10)	0,56 (9)	2,02 (16)	0,92 (5)	0,92 (8)
Acido heptanóico	- -	0,23 (9)	0,06 (4)	0,04 (4)	0,03 (17)	0,01 (5)	- -	0,07 (11)	0,06 (12)	- -	0,13 (4)	- -	0,10 (13)	0,05 (16)	0,07 (17)
Ácido 2-etilhexanóico	0,19 (19)	- -	0,08 (17)	- -	- -	- -	- -	- -	0,08 (15)	0,19 (20)	0,18 (18)	0,03 (14)	0,10 (1)	- -	0,02 (10)
Ácido octanóico	4,63 (13)	2,43 (20)	3,56 (22)	0,09 (14)	0,32 (14)	0,85 (19)	0,16 (13)	1,57 (10)	1,92 (12)	1,59 (3)	1,78 (15)	0,51 (12)	2,61 (20)	1,37 (12)	1,48 (12)
Ácido nonanóico	0,31 (14)	0,02 (14)	0,26 (14)	0,05 (3)	0,09 (17)	0,15 (14)	- -	0,36 (19)	0,17 (8)	0,14 (11)	0,50 (20)	0,35 (6)	0,57 (8)	0,23 (19)	0,56 (15)
Ácido decanóico	1,38 (20)	0,60 (3)	1,51 (18)	0,03 (11)	0,31 (10)	0,37 (4)	0,12 (20)	0,35 (5)	0,28 (3)	0,56 (13)	0,54 (18)	0,17 (15)	0,43 (16)	0,25 (15)	1,12 (17)
Ácido dodecanóico	0,22 (14)	1,82 (1)	0,25 (19)	0,66 (12)	2,98 (18)	4,01 (19)	0,78 (14)	0,67 (14)	0,46 (15)	0,71 (14)	0,50 (19)	0,17 (17)	0,22 (24)	0,95 (4)	0,23 (12)
Ácido tetradecanóico	0,54 (20)	0,66 (7)	0,29 (25)	0,20 (13)	1,03 (14)	2,85 (24)	0,55 (11)	1,65 (15)	0,53 (19)	0,94 (7)	0,23 (12)	0,20 (19)	0,33 (16)	0,50 (12)	0,82 (20)
Acido pentadecanóico	0,18 (22)	- -	0,08 (21)	- -	0,10 (11)	0,64 (13)	- -	0,24 (12)	0,25 (14)	0,29 (16)	0,15 (17)	0,35 (20)	0,26 (20)	0,09 (5)	0,35 (13)
Acido hexadecanóico	1,62 (17)	0,38 (5)	1,28 (18)	0,12 (2)	0,54 (13)	0,29 (19)	0,78 (14)	2,54 (15)	0,79 (6)	1,78 (14)	1,11 (20)	0,55 (19)	0,68 (19)	1,43 (16)	2,88 (19)
Ácido 9-octadecenóico	0,16 (16)	- -	0,10 (17)	- -	- -	- -	- -	- -	- -	0,07 (14)	- -	- -	- -	0,03 (5)	- -
Total Áreas	55,92 (17)	23,27 (11)	33,54 (16)	18,78 (18)	76,91 (18)	63,85 (4)	25,54 (17)	50,35 (14)	64,36 (13)	48,34 (13)	53,52 (7)	51,03 (5)	58,99 (16)	63,80 (10)	63,64 (10)

Legenda:

*Idade do vinho

^b Após estufagem

^d Desvio padrão relativo, expresso em percentagem

(A) Produtor A

^a Antes da estufagem

^c Média de três réplicas

(b) *blended*

(B) Produtor B

III. Resultados e discussão

Tabela 12 – Continuação

Ácidos Orgânicos Voláteis	Vinho Meio Doce					
	Bual					
	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4	Amostra 5	
	Área do pico GC × GC ^d (x10 ⁶) (RSD ^e %)					
Ácido acético	18,99 (10)	26,05 (18)	15,75 (19)	46,26 (16)	44,85 (20)	
Ácido propanóico	0,27 (13)	0,25 (10)	0,19 (15)	0,74 (10)	0,14 (12)	
Ácido 2-metilpropanóico	1,94 (16)	1,14 (4)	1,47 (16)	0,93 (15)	1,04 (16)	
Ácido butanóico	0,39 (11)	0,32 (18)	1,16 (5)	1,93 (24)	3,71 (12)	
Ácido 3-metilbutanóico	1,70 (17)	0,54 (16)	2,18 (15)	1,64 (14)	1,30 (16)	
Ácido 2-metilbutanóico	0,82 (19)	- -	0,06 (15)	- -	0,23 (22)	
Acido pentanóico	- -	- -	0,02 (13)	0,04 (15)	0,06 (9)	
Ácido hexanóico	2,26 (16)	1,19 (8)	1,39 (4)	1,70 (12)	1,37 (15)	
Acido heptanóico	0,04 (22)	- -	0,08 (23)	0,07 (26)	- -	
Ácido 2-etilhexanóico	0,08 (23)	0,05 (8)	0,11 (26)	0,15 (5)	- -	
Ácido octanóico	3,81 (12)	1,73 (21)	1,98 (10)	2,92 (11)	1,75 (16)	
Ácido nonanóico	0,28 (26)	0,14 (3)	0,16 (16)	0,32 (27)	0,31 (19)	
Ácido decanóico	0,51 (23)	0,42 (13)	0,57 (17)	0,39 (18)	0,29 (15)	
Ácido dodecanóico	0,26 (21)	0,13 (19)	0,16 (23)	0,25 (17)	0,16 (5)	
Ácido tetradecanóico	0,45 (12)	0,52 (17)	0,25 (22)	0,31 (10)	0,15 (27)	
Acido pentadecanóico	0,25 (14)	0,19 (8)	0,15 (19)	0,04 (19)	- -	
Acido hexadecanóico	2,04 (3)	1,33 (16)	1,57 (23)	0,55 (22)	0,45 (9)	
Ácido 9-octadecenóico	0,11 (4)	0,10 (18)	0,05 (16)	- -	- -	
Total (Áreas picos GC × GC)	34,18 (13)	34,10 (6)	27,31 (2)	58,25 (3)	55,82 (23)	

Na Figura 41 é possível visualizar-se a variação dos teores dos diferentes ácidos orgânicos voláteis presentes nas amostras de vinho Madeira em função da idade dos vinhos. Foram utilizadas as amostras de vinho da casta Sercial, uma vez que se dispunha de várias amostras de vinho com idade conhecida (2, 6, 16 e 32 anos).

Foi possível distinguir-se três comportamentos distintos com o aumento da idade dos vinhos (Figura 41): os ácidos de cadeia curta (C₃ – C₅) aumentam; os ácidos de cadeia média (C₆ – C₁₂) diminuem; já os ácidos de cadeia longa (C₁₄ – C₁₈) registam um aumento do seu teor. Estes comportamentos foram igualmente registados para as amostras das restantes castas. Câmara *et al.* [20] também já havia descrito o comportamento de alguns destes ácidos, salientando-se o aumento dos ácidos de cadeia curta e a diminuição dos ácidos de cadeia média (não foram reportados neste trabalho os ácidos de cadeia longa identificados neste trabalho). Assim, o aumento do teor dos ácidos de cadeia curta e longa

III. Resultados e discussão

poderão ser responsáveis pelo aumento de acidez total observado para as amostras de vinho Madeira em estudo.

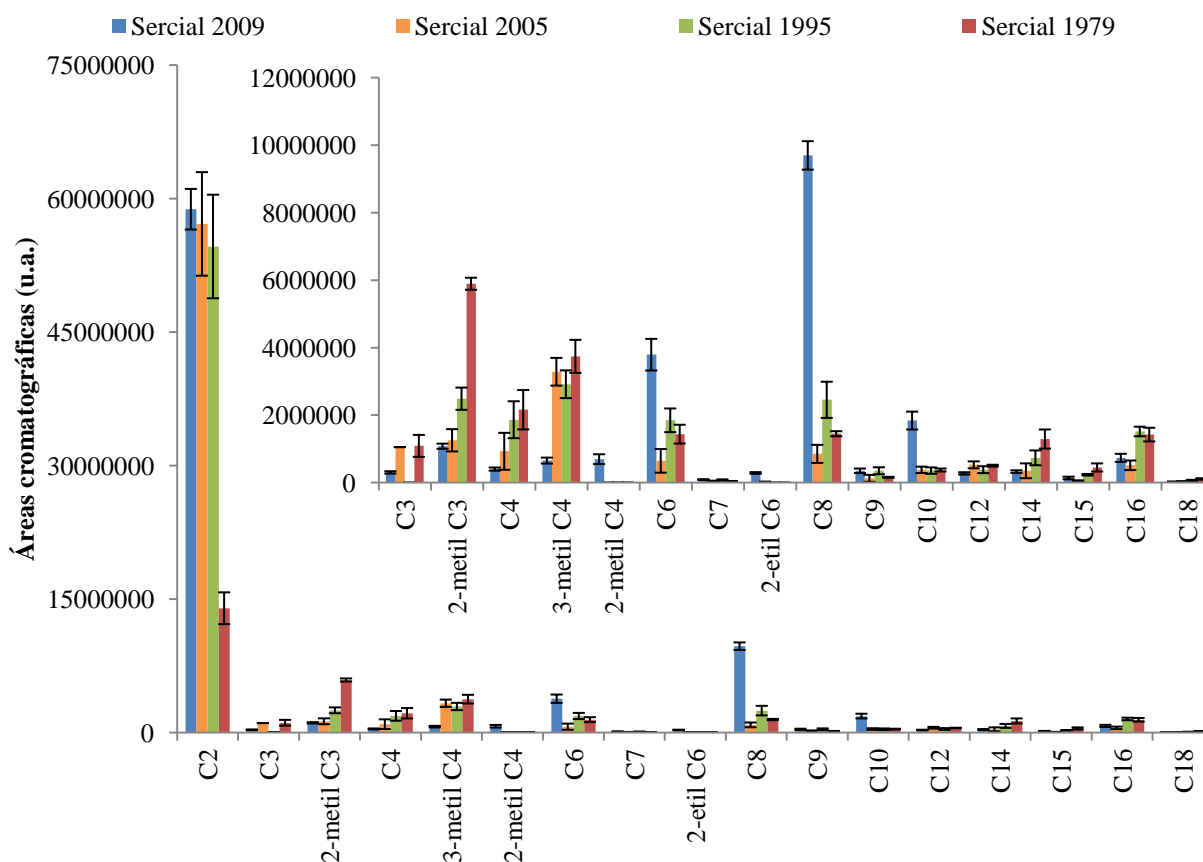


Figura 41 - Áreas cromatográficas (u.a.) dos diferentes ácidos orgânicos para as amostras de vinho da casta Sercial

Durante o envelhecimento do vinho pode ocorrer o fenómeno de esterificação, em que os ácidos reagem com o etanol presente no vinho, dando origem a ésteres, como por exemplo o butanoato de etilo. Para além disso podem decorrer reacções de hidrólise dos ésteres, originando os ácidos correspondentes. Estas reacções encontram-se em equilíbrio [97]. O aumento do teor dos ácidos de cadeia curta e a diminuição dos ácidos de cadeia média verificados neste estudo poderão estar associados a este tipo de reacções, ou seja, os ácidos de cadeia curta estarão a ser formados por reacções de hidrólise, enquanto os ácidos de cadeia média estarão a sofrer reacções de esterificação, diminuindo o seu teor com o envelhecimento dos vinhos. Seria necessário monitorizar o comportamento dos ésteres para confirmar estes dados.

Quanto aos ácidos de cadeia longa, o seu teor aumentou com a idade dos vinhos. Deve ter-se em conta que o tempo de extracção utilizado neste trabalho (20 min.) é

III. Resultados e discussão

limitante na extracção deste tipo de compostos uma vez que não é atingido o equilíbrio e poucos serão os compostos de cadeia longa que irão volatilizar, no entanto consegue-se visualizar um aumento do seu teor. Isto poderá indicar que o seu teor nos vinhos é bastante superior ao observado (seria necessário efectuar-se uma injeção directa no GC \times GC-ToFMS). Um factor que poderá estar a contribuir para este aumento prende-se com a transferência dos ácidos orgânicos da madeira dos cascos de carvalho (utilizados no envelhecimento dos vinhos Madeira). De Rosso *et al.* [98] reporta a composição volátil da madeira de carvalho, onde se detectaram níveis elevados (entre 1-10, ou em alguns casos $> 10 \mu\text{g/g}$ madeira) do ácido dodecanóico, tetradecanóico, hexadecanóico e ácido 9-octadecenóico. Uma vez que com o aumento da idade, estes vinhos estão mais tempo em contacto com a madeira dos cascos de carvalho, poderá ocorrer uma maior migração destes compostos para o vinho, contribuindo assim para o aumento do teor destes, e consequentemente no incremento da acidez total dos vinhos. A nível sensorial, estes ácidos orgânicos voláteis de cadeia longa, quando presentes a concentrações superiores ao LPS, pode contribuir com odores característicos a madeira e a gordura, enquanto os ácidos de orgânicos voláteis de cadeia curta são considerados *off-flavours* pois, quando em concentrações superiores ao seu LPS, contribuem com odores característicos a queijo e a ranço (factor importante a ter em conta pelos produtores).

A Figura 42 mostra o gráfico da idade observada em função da idade estimada pela Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLS). A idade estimada dos vinhos tem um erro associado (RMSEC) de 48,95% e uma correlação de 0,727, sendo que o modelo foi estipulado usando 3 variáveis latentes.

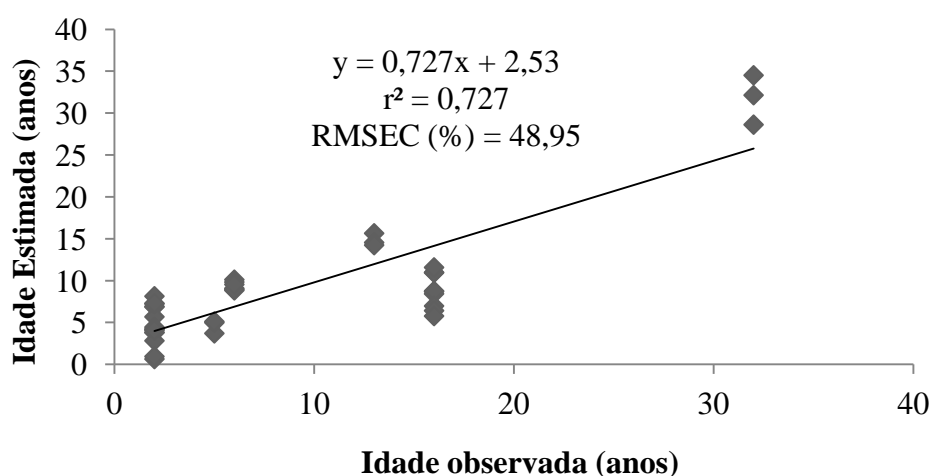


Figura 42 – Idade observada dos vinhos versus a idade estimada pelo modelo de calibração obtido por PLS

III. Resultados e discussão

A Figura 43 corresponde a uma representação gráfica dos loadings em que se verifica que o ácido acético tem a mesma influência para todas as amostras, não sendo um ácido orgânico com grande impacto no aumento da acidez total dos vinhos com a idade (também possível observar-se nas Tabela 11 e 12 que os níveis de ácido acético são inconstantes, não se verificando um aumento do teor com o incremento da idade). Os ácidos que demonstram um maior impacto são o 2-metil propanóico, 3-metil propanóico e o octanóico. A formação destes ácidos ocorre durante a fermentação alcoólica, mais propriamente durante o metabolismo dos lípidos (ácido octanóico) e a partir dos α -cetoácidos (ácido 2-metil propanóico e 2-metilbutanóico), pela levedura. O menor impacto dos ácidos orgânicos de cadeia longa nos loadings poderá estar associado às limitações da extracção utilizada neste trabalho, já discutido anteriormente, daí não se verificar o efeito destes nesta figura.

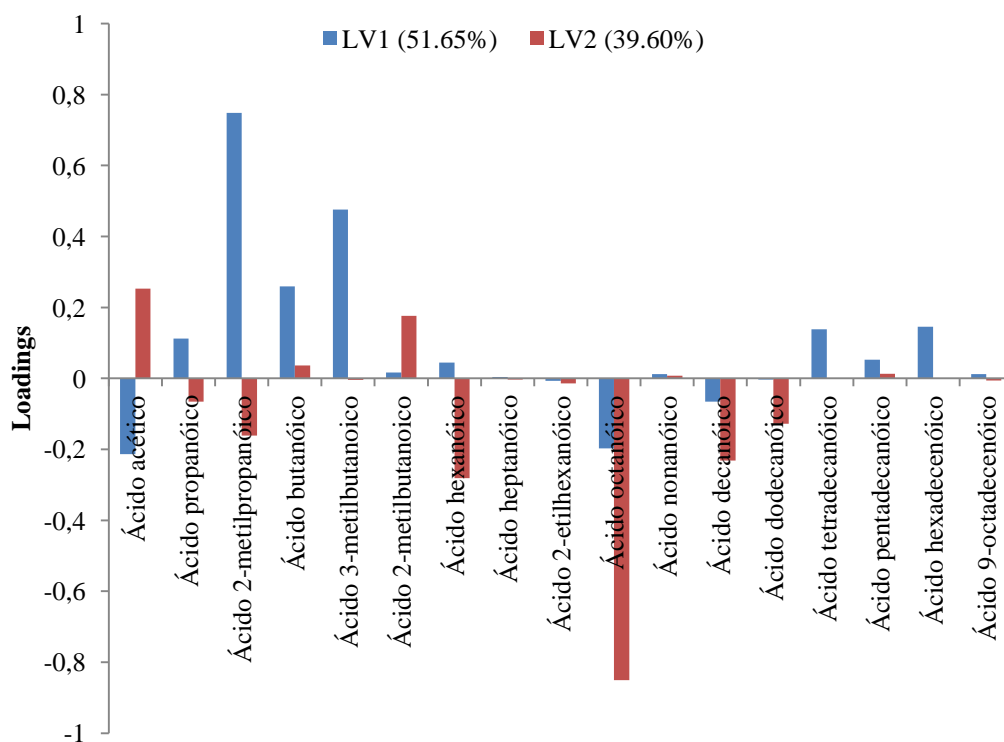


Figura 43 - Loadings dos ácidos orgânicos voláteis

Capítulo IV. Conclusões

Capítulo IV - Conclusões

O carbamato de etilo (EC), também conhecido como uretano, é um composto que foi reclassificado, em 2007, como um composto provavelmente carcinogénico para humanos (grupo 2A) pela Agência Internacional de Pesquisa contra o Cancro (IARC). É possível encontra-se o EC em várias bebidas alcoólicas e alimentos fermentados, nomeadamente em vinho Madeira. Este trabalho foi realizado com intuito de definir estratégias conducentes para a redução da formação de EC em vinhos Madeira. A formação de EC em vinhos Madeira é condicionada por diversos factores, sendo que neste trabalho foram abordados alguns factores intrínsecos, nomeadamente a casta, tipo de vinho e processo; e factores extrínsecos, tais como a luz, temperatura e o tempo de armazenamento. Paralelamente, foi estabelecido o perfil em ácidos orgânicos voláteis com vista a explicar o aumento de acidez observada durante o envelhecimento dos vinhos Madeira.

Neste trabalho foi aplicada a metodologia microextração em fase sólida em modo espaço de cabeça combinada com cromatografia compreensiva bidimensional em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa por tempo de voo (HS-SPME/GC \times GC-ToFMS). Esta metodologia foi adaptada de Perestrelo *et al.* [62], com a introdução do padrão interno, o carbamato de propilo (PC), com intuito de diminuir a variabilidade dos resultados; obtendo-se assim menores valores de limite de detecção (LOD) e quantificação (LOQ), para vinhos modelo doces e secos, comparativamente aos obtidos por Perestrelo *et al.* [62]. Obteve-se uma boa sensibilidade e linearidade com coeficientes de regressão (r^2) de 0,986 e de 0,996 para os vinhos sintéticos seco/meio seco e doce/meio doce, respectivamente. Os limites de detecção e quantificação obtidos para um vinho sintético seco/meio seco foram de 3,52 e 11,7 $\mu\text{g/L}$, enquanto para um vinho sintético doce/meio doce foi de 1,54 e 5,13 $\mu\text{g/L}$, respectivamente.

Após a validação da metodologia, procedeu-se à análise da cinética de formação do EC em diferentes condições:

- avaliação do efeito da casta e do tipo de vinho;
- análise do efeito do teor de glucose em vinhos modelo;
- estudo do efeito do tipo de açúcar em vinhos modelo;
- observação do efeito do processo de estufagem em vinhos Madeira;
- verificação do efeito das condições de armazenamento (luz, temperatura e tempo)

em vinhos Madeira.

Capítulo IV - Conclusões

A casta e o tipo de vinho (dois factores intrinsecamente associados), demonstraram influência nos teores de EC, dado que a casta Malvasia (vinho doce) e Bual (vinho meio doce) foram as que apresentaram teores mais elevados de EC, comparativamente às castas Sercial (vinho seco) e Verdelho (vinho meio doce). Com intuito de explicar o motivo pelo qual os vinhos Madeira doce e meio doce apresentavam maiores teores de CE comparativamente aos secos e meio secos, foi efectuado um estudo com 2 açúcares estruturalmente semelhantes (glucose e sorbitol), no qual diferem apenas num grupo carbonilo. De acordo com os dados obtidos, o EC apenas se formou na presença de glucose, ou seja este açúcar actua como um catalisador da reacção. Relativamente ao tempo de armazenamento destes vinhos sintéticos, observa-se que a formação de EC aumenta nos primeiros 55 dias, seguindo uma cinética de 1ª ordem, estabilizando após esse período.

O processamento dos vinhos Madeira pode decorrer de dois modos: estufagem e canteiro. Contudo, a estufagem é o método mais vulgarmente utilizado, pois permite ao vinho Madeira adquirir as suas propriedades sensoriais únicas, num tempo mais curto que pelo processo canteiro. A formação do CE durante a estufagem deve-se à temperatura aplicada (45 ± 5 °C), o qual foi observado nos resultados obtidos neste trabalho.

As condições de armazenamento dos vinhos Madeira também evidenciaram importância para que os teores de EC não sejam superiores ao limite internacional estabelecido pelo Canadá ($100 \mu\text{g/L}$). Tal como já havia sido reportado por Steven e Ough [47], é essencial que o armazenamento seja feito a uma temperatura inferior a 24 °C, sendo verificado que uma temperatura de 4°C não ocorre formação de EC. No presente trabalho foram testadas 3 temperaturas (4, temperatura ambiente – 25 °C, 40°C), e de acordo com os resultados não se observou a formação de EC aos 4 °C, contudo aos 25 e 40 °C verifica-se um aumento de EC de cerca de 100 e 145 $\mu\text{g/L}$, que corresponde uma cinética de 1ª ordem do teor de EC durante os primeiros 33 dias de armazenamento, estabilizando após esse período. A não formação de EC aos 4 °C deve-se provavelmente à variação da entalpia da reacção entre a glucose e a ureia que é positiva (reacção não espontânea). Somente com o fornecimento de energia externa (aumento de temperatura, neste caso 25 e 40 °C) é que são criadas as condições para ocorrência da reacção. Estes resultados sugerem que os primeiros dias de armazenamento são cruciais para a formação de EC, devendo dar-se especial atenção a este período. Quanto ao efeito da luz, verifica-se que não é necessário um

Capítulo IV - Conclusões

cuidado especial sob a forma como o vinho é engarrafado e posteriormente armazenado, uma vez que não se observaram efeitos significativos na formação de EC.

Paralelamente à problemática do EC em vinhos Madeira, surgiu outro desafio onde se pretendeu estabelecer o perfil em ácidos orgânicos voláteis com intuito de explicar o aumento da acidez com o envelhecimento dos vinhos, já reportado na literatura [20]. Este aumento de acidez influencia as propriedades sensoriais do vinho Madeira, uma vez que os ácidos orgânicos voláteis de cadeia curta, quando presentes em concentrações superiores ao seu LPS, podem contribuir com *off-flavours*, nomeadamente, odores a queijo e a ranço.

Foram identificados 18 ácidos orgânicos voláteis por HS-SPME/GC \times GC-ToFMS, dos quais 4 nunca tinham sido reportados em vinho Madeira. O aumento da acidez com o envelhecimento dos vinhos, verificado neste trabalho experimental, pode dever-se ao incremento dos ácidos orgânicos de cadeia curta ($C_3 - C_5$) e longa ($C_{14} - C_{18}$), sendo que o comportamento destes últimos nunca havia sido referido na literatura. As reacções de hidrólise poderão ser as responsáveis pelo aumento do teor dos ácidos orgânicos de cadeia curta; já os ácidos de cadeia longa deverão provir da transferência desses compostos a partir da madeira dos cascos de carvalho (tempos maiores de exposição favorecerão este tipo de reacções), uma vez que este tipo de madeira mostrou ter estes compostos na sua composição volátil [98]. Uma vez que o tempo de extracção utilizado foi de 20 min, no qual se trabalhou numa situação de não equilíbrio, ocorre pouca volatilização dos compostos com elevado peso molecular. No entanto, observou-se um aumento do teor destes compostos com a idade dos vinhos, o que sugere que possivelmente estes se encontram em teores mais elevados. O modelo obtido por Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLS) estima que a idade dos vinhos tem um erro de 48,95%.

Este trabalho evidencia a multiplicidade de factores que se encontram associados à formação de EC, não sendo possível indicar um único parâmetro a alterar no processo de vinificação ou armazenamento para reduzir a sua formação. Com esta aquisição de conhecimento, permite-se sugerir algumas estratégias:

- i) os processos de vinificação e armazenamento deverão ser adaptados em função da casta, tipo de vinho e tempo de envelhecimento expectável;
- ii) as castas que originam vinhos doces ou meio doces, mais susceptíveis de originar vinhos com maior teor de EC, deverão ser preferencialmente processadas a

Capítulo IV - Conclusões

temperaturas baixas, ou seja, deverá ser feito um balanço entre as propriedades organolépticas desejadas para os vinhos, sem comprometer a formação de EC. Para tal, aconselha-se efectuar uma optimização de tempo vs temperatura de estufagem. O canteiro poderá ser uma alternativa, mas devido ao tempo requerido para que um vinho Madeira atinja a sua excelência, não é financeiramente viável.

iii) sempre que possível armazenar os vinhos a 4 °C. No entanto, dado ser impossível armazenar todos os vinhos Madeira a esta temperatura, dado o elevado impacto financeiro, deve dar-se especial atenção aos vinhos doces/meio doces. Esta estratégia deverá também ser tida em conta para os vinhos de lote (que são vendidos com pouco tempo de armazenamento).

Os resultados obtidos com a realização do presente trabalho abrem várias linhas de acção para trabalhos futuros no sentido de melhorar a qualidade e estabilidade dos vinhos Madeira.

Trabalho Futuro:

No seguimento do trabalho realizado surgiram várias linhas de acção, das quais se enumeram as seguintes:

- variação do processo de estufagem, ou seja, modificação do processo em dois parâmetros: temperatura e tempo, com intuito de diminuir a formação de EC durante este processo.
- utilização da enzima urease em vinhos modelo, e posteriormente com mostos de vinho Madeira, para tentar reduzir o teor de ureia presente nos vinhos;
- análise de uma maior diversidade de amostras (com diferentes idades), para se conseguir uma representação mais significativa, e dessa forma, conseguir-se entender o efeito da idade no teor de EC nos vinhos;
- análise da variação do teor de ésteres com o aumento da idade dos vinhos, com intuito de perceber as reacções de esterificação/hidrólise que ocorrem durante o envelhecimento dos vinhos.

Bibliografia

Bibliografia

1. Wikipédia. *Vinho da Madeira*. 2011 [consultado 15-10-2010]; Disponível em: http://pt.wikipedia.org/wiki/Vinho_Madeira.
2. IVBAM. [consultado em 15/10/2010; Disponível em: www.vinhomadeira.pt.
3. Madeira Wine Guide. [consultado em 15-10-2010; Disponível em: <http://www.madeirawineguide.com/>.
4. Reader, H. P., Dominguez, M., *Fortified wines: sherry, port and Madeira*, in *Fermented Beverage Production*, A.G.H. Lea; and J.R. Piggott, Editors. 1995. p. 159-207.
5. Perestrelo, R., Albuquerque, F., Rocha, S. M., Câmara, J. S., *Distinctive Characteristics of Madeira Wine Regarding Its Traditional Winemaking and Modern Analytical Methodologies*. *Advances in Food and Nutrition Research*, 2011. **63**(7): p. 207-249.
6. Fernandes, J. C. *Mapa da Ilha da Madeira*. 2004 [consultado 27-09-2011]; Disponível em: <http://ilhadamadeira.weblog.com.pt/arquivo/056796.html>.
7. Barreto, R. P. *O novo vinho brasileiro*. 2010 [consultado 15-10-2010]; Disponível em: <http://www.annaramalho.com.br/news/amigos-da-anna/reinaldo-paes-barreto/3283-o-novo-vinho-brasileiro.html>.
8. Bjelkaroy, Barbosa. 1997 [consultado 15-10-2010]; Disponível em: <http://www.madeirawine.com/>.
9. Marques, J. C. 2009 [consultado 15-10-2010]; Disponível em: <http://www3.uma.pt/jcmarques/madeirawine.htm>.
10. Campo, E., Ferreira, V., Escudero, A., Marqués, J. C., Cacho, J., *Quantitative gas chromatography-olfactometry and chemical quantitative study of the aroma of four Madeira wines*. *Analytica Chimica Acta*, 2006. **563**(180-187).
11. Schuster, M., *O essencial sobre a prova*. 2001, Lisboa: Edições Cotovia.
12. Rapp, A., Mandery, H., *Wine aroma*. *Experientia* Vol. 43. 1986.
13. Segredos do Vinho. *Vinhos Madeira*. [consultado 28-09-2011]; Disponível em: <http://www.segredosdovinho.com.br/artigos/vinhomadeira/vinhomadeira.html>.
14. Lambrechts, M. G., Pretorius, I. S., *Yeast and its importance to wine aroma - a review*. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 2000. **21**(Special Issue): p. 97-129.
15. Garcia, C. A. S., *Controlo de Qualidade dos vinhos - Química Enológica*, in *Métodos analíticos*. 1998, Instituto da Vinha e do vinho.

Bibliografia

16. Silva, H. O., de Pinho, P. G., Machado, B. P., Hogg, T., Marques, J. C., Camara, J. S., Albuquerque, F., Ferreira, A. C. S., *Impact of Forced-Aging Process on Madeira Wine Flavor*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008. **56**(24): p. 11989-11996.
17. Pereira, A. C., Reis, M. S., Saraiva, P. M., Marques, J. C., *Analysis and assessment of Madeira wine ageing over an extended time period through GC-MS and chemometric analysis*. Analytica Chimica Acta, 2010. **660**(1-2): p. 8-21.
18. Pereira, A. C., Reis, M. S., Saraiva, P. M., Marques, J. C., *Aroma ageing trends in GC/MS profiles of liqueur wines*. Analytica Chimica Acta, 2010. **659**(1-2): p. 93-101.
19. Câmara, J. S., Alves, M. A., Marques, J. C., *Multivariate analysis for the classification and differentiation of Madeira wines according to main grape varieties*. Talanta, 2006. **68**: p. 1512-1521.
20. Câmara, J. S., Alves, M. A., Marques, J. C., *Changes in volatile composition of Madeira wines during their oxidative ageing*. Analytica Chimica Acta, 2006. **563**: p. 188-197.
21. Perestrelo, R., Fernandes, A., Albuquerque, F. F., Marques, J. C., Câmara, J. S., *Analytical characterization of the aroma of Tinta Negra Mole red wine: Identification of the main odorants compounds*. Analytica Chimica Acta, 2006. **563**: p. 154-164.
22. Mendes, B., Gonçalves, J., Câmara, J. S., *Effectiveness of high-throughput miniaturized sorbent- and solid phase microextraction techniques combined with gas chromatography–mass spectrometry analysis for a rapid screening of volatile and semi-volatile composition of wines—A comparative study*. Talanta, 2011.
23. Baan, R., Straif, K., Grosse, Y., Secretan, B., Ghissassi, F. E., Bouvard, V., Altieri, A., Coglianò, V., *Carcinogenicity of alcoholic beverages*. Policy Watch, The Lancet Oncology, 2007. **8**(4): p. 292-293.
24. WHO. 2011 [consultado 16-7-2011]; Disponível em: <http://www.who.int/en/>.
25. FAO. 2011 [consultado 16-07-2011]; Disponível em: <http://faostat.fao.org/site/291/default.aspx>.
26. INE. 2011 [consultado 16-07-2011]; Disponível em: www.ine.pt.
27. Clube de Vinhos. *O vinho e os seus benefícios para a saúde*. 2010 [consultado 25-09-2011]; Disponível em: <http://clubedevinhos.com/artigos/vinho-seus-beneficios-para-saude>.

Bibliografia

28. Ministério da Saúde. *Problemas ligados ao álcool*. Portal da Saúde 2011 [consultado 25-09-2011]; Disponível em: <http://www.min-saude.pt/portal/conteudos/enciclopedia+da+saude/estilos+de+vida/alcoolismo.htm>.
29. Dr J. Abbey, C. M. J. T. *A snapshot of FSANZ recent survey activities*. 2008 [consultado 28 Novembro 2010]; Disponível em: http://www.foodstandards.gov.au/_srcfiles/Snapshot%20Poster.pdf.
30. CFS, *Ethyl Carbamate in Local Fermented Foods*. 2009, The Government of the Hong Kong Special Administrative Region - Food and Environmental Hygiene Department: Hong Kong. p. 1-38.
31. IARC, *Urethane*. IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Man. Some Antithyroid and Related Substances, Nitrofurans and Industrial Chemicals, 1974. **7**: p. 111.
32. Ough, C. S., *Ethylcarbamate in fermented beverages and foods. 1. Naturally occurring ethylcarbamate*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1976. **24**(2): p. 323-328.
33. Field, K. J., Lang, C. M., *Hazards of urethane (ethyl carbamate) - A review of the literature*. Laboratory Animals, 1988. **22**(3): p. 255-262.
34. Hara, K., Harris, R. A., *The anesthetic mechanism of urethane: The effects on rotransmitter-gated ion channels*. Anesthesia and Analgesia, 2002. **94**(2): p. 313-318.
35. Weber, J. V., Sharypov, V. I., *Ethyl carbamate in foods and beverages: a review*. Environmental Chemistry Letters, 2009. **7**(3): p. 233-247.
36. JECFA, *Summary and conclusions of the sixty-fourth meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA)*. 2005: Rome, Italy. p. 19-23.
37. EFSA, *Ethyl carbamate and hydrocyanic acid in food and beverages - Scientific Opinion of the Panel on Contaminants*. The EFSA Journal, 2007. **551**: p. 1-44.
38. Aresta, M., Boscolo, M., Franco, D. W., *Copper(II) catalysis in cyanide conversion into ethyl carbamate in spirits and relevant reactions*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2001. **49**(6): p. 2819-2824.
39. Horii, S., Goto, K., *Determination of Ethyl Carbamate in Sake Using Headspace Solid Phase Microextraction*. Journal of the Institute of Brewing, 2010. **116**(2): p. 177-181.
40. Pereira, V., Pontes, M., Câmara, J. S., Marques, J. C., *Simultaneous analysis of free amino acids and biogenic amines in honey and wine samples using in loop*

Bibliografia

- orthophthalaldehyde derivatization procedure*. Journal of Chromatography A, 2008. **1189**: p. 435–443.
41. Ough, C. S., Crowell, E. A., Gutlove, B. R., *Carbamyl Compound Reactions with Ethanol*. American Journal of Enology and Viticulture, 1988. **39**(3): p. 239-242.
42. Ough, C. S., Crowell, E. A., Mooney, L. A., *Formation of Ethyl Carbamate precursors during grape juice (Chardonnay) Fermentation .I. Addition of amino-acids, urea, and ammonia - Effects of fortification on intracellular and extracellular precursors*. American Journal of Enology and Viticulture, 1988. **39**(3): p. 243-249.
43. Monteiro, F. F., Trousdale, E. K., Bisson, L. F., *Ethyl Carbamate formation in wine - Use of radioactively labeled precursors to demonstrate the involvement of urea*. American Journal of Enology and Viticulture, 1989. **40**(1): p. 1-8.
44. Mosqueira, A., *Carbamato de Etilo em Vinhos Portugueses*, in *Faculdade Farmácia*. 2007, Universidade de Lisboa.
45. Jacobson, R. A., *Carbamic esters from urea*. Journal of the American Chemical Society, 1938. **60**: p. 1742-1744.
46. Hasnip, S., Caputi, A., Crews, C., Brereton, P., *Effects of storage time and temperature on the concentration of ethyl carbamate and its precursors in wine*. Food Additives and Contaminants, 2004. **21**(12): p. 1155-1161.
47. Stevens, D. F., Ough, C. S., *Ethyl carbamate formation - Reaction of urea and citrulline with ethanol in wine under low to normal temperature conditions*. American Journal of Enology and Viticulture, 1993. **44**(3): p. 309-312.
48. Jagerdeo, E., Dugar, S., Foster, G. D., Schenck, H., *Analysis of ethyl carbamate in wines using solid-phase extraction and multidimensional gas chromatography/mass spectrometry*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002. **50**(21): p. 5797-5802.
49. Nóbrega, I. C. C., Pereira, J. A. P., Paiva, J. E., Lachenmeier, D. W., *Ethyl carbamate in pot still cachaças (Brazilian sugar cane spirits): Influence of distillation and storage conditions*. Food Chemistry, 2009. **117**(4): p. 693-697.
50. Ferreira, M. A., Fernandes, J. O., *The application of an improved GS-MS procedure to investigate ethyl carbamate behavior during the production of Madeira Wines*. American Journal of Enology and Viticulture, 1992. **43**(4): p. 339-343.

Bibliografia

51. Kodama, S., Suzuki, T., Fujinawa, S., Teja, P. d. I., Ka, F. Y., *Urea Contribution to Ethyl Carbamate Formation in Commercial Wines During Storage*. American Journal of Enology and Viticulture, 1994. **45**(1): p. 17-24.
52. Tegmo-Larsson, I.-M., Spitter, T. D., *Temperature and Light Effects on Ethyl Carbamate Formation in Wine During Storage*. Journal of Food Science, 1990. **55**(4): p. 1166-1167.
53. Uthurry, C. A., Varela, F., Colomo, B., Lepe, J. A. S., Lombardero, J., del Hierro, J. R. G., *Ethyl carbamate concentrations of typical Spanish red wines*. Food Chemistry, 2004. **88**(3): p. 329-336.
54. Cairns, T., Siegmund, E. G., Luke, M. A., Doose, G. M., *Residue levels of ethyl carbamate in wines and spirits by gas-chromatography and mass-spectrometry/mass-spectrometry*. Analytical Chemistry, 1987. **59**(17): p. 2055-2059.
55. Brumley, W. C., Canas, B. J., Perfetti, G. A., Mossoba, M. M., Sphon, J. A., Corneliussen, P. E., *Quantitation of ethyl carbamate in whiskey, sherry, port and wine by gas-chromatography tandem mass-spectrometry using a triple quadrupole mass-spectrometer*. Analytical Chemistry, 1988. **60**(10): p. 975-978.
56. Clegg, B. S., Frank, R., *Detection and quantitation of trace levels of ethyl carbamate in alcoholic beverages by selected ion monitoring*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1988. **36**(3): p. 502-505.
57. Funch, F., Lisbjerg, S., *Analysis of ethyl carbamate in alcoholic beverages*. Zeitschrift Fur Lebensmittel-Untersuchung Und-Forschung, 1988. **186**(1): p. 29-32.
58. Herbert, P., Santos, L., Bastos, M., Barros, P., Alves, A., *New HPLC method to determine ethyl carbamate in alcoholic beverages using fluorescence detection*. Journal of Food Science, 2002. **67**(5): p. 1616–1620.
59. Whiton, R. S., Zoecklein, B. W., *Determination of Ethyl Carbamate in Wine by Solid-Phase Microextraction and Gas Chromatography/Mass Spectrometry*. American Journal of Enology and Viticulture, 2002. **53**(1): p. 60-63.
60. Abreu, S. M., Alves, A., Oliveira, B., Herbert, P., *Determination of ethyl carbamate in alcoholic beverages: an interlaboratory study to compare HPLC-FLD with GC-MS methods*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2005. **382**(2): p. 498-503.

Bibliografia

61. Zhang, Y., Zhang, J., *Optimization of headspace solid-phase microextraction for analysis of ethyl carbamate in alcoholic beverages using a face-centered cube central composite design*. Analytica Chimica Acta, 2008. **627**(2): p. 212-218.
62. Perestrelo, R., Petronilho, S., Camara, J. S., Rocha, S. M., *Comprehensive two-dimensional gas chromatography with time-of-flight mass spectrometry combined with solid phase microextraction as a powerful tool for quantification of ethyl carbamate in fortified wines. The case study of Madeira wine*. Journal of Chromatography A, 2010. **1217**(20): p. 3441-3445.
63. Madrera, R. R., Valles, B. S., *Determination of ethyl carbamate in cider spirits by HPLC-FLD*. Food Control, 2009. **20**(2): p. 139-143.
64. Park, S. K., Kim, C. T., Lee, J. W., Jhee, O. H., Om, A. S., Kang, J. S., Moon, T. W., *Analysis of ethyl carbamate in Korean soy sauce using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection or tandem mass spectrometry and gas chromatography with mass spectrometry*. Food Control, 2007. **18**(8): p. 975-982.
65. Cruz, M. H. C. d. L., Juliana S. de Mattos, Fernanda F. Nunes, Suyane D. Sá de Alvarenga, Tânia M. Monteiro, Raquel D. C. Cunha, Janaína M. Rodrigues, Francisco R. de Aquino Neto, Cunha, V. S., *High Precision Method for the Determination of Ethyl Carbamate in Cachaça by HRGC-MS*, in *Simposio de Metrologia 2008*. 2008: México. p. 1-7.
66. Pawliszyn, J., Pawliszyn, B., Pawliszyn, M., *Solid Phase Microextraction (SPME)*. The Chemical Educator, 1997. **2**(4): p. 1-7.
67. Tat, L., Comuzzo, P., Stolfo, I., Battistutta, F., *Optimization of wine headspace analysis by solid-phase microextraction capillary gas chromatography with mass spectrometric and flame ionization detection*. Food Chemistry, 2005. **93**(2): p. 361-369.
68. Jelen, H. H., Wlazly, K., Wasowicz, E., Kaminski, E., *Solid-phase microextraction for the analysis of some alcohols and esters in beer: Comparison with static headspace method*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1998. **46**(4): p. 1469-1473.
69. Vallejo-Cordoba, B., Gonzalez-Cordova, A. F., del Carmen Estrada-Montoya, M., *Tequila volatile characterization and ethyl ester determination by solid phase microextraction gas chromatography/mass spectrometry analysis*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004. **52**(18): p. 5567-5571.

Bibliografia

70. Zhang, Z. Y., Pawliszyn, J., *Headspace solid-phase microextraction*. Analytical Chemistry, 1993. **65**(14): p. 1843-1852.
71. Kataoka, H., Lord, H. L., Pawliszyn, J., *Applications of solid-phase microextraction in food analysis*. Journal of Chromatography A, 2000. **880**: p. 35-62.
72. Ormsby, M., *Analysis of laminated documents using solid-phase microextraction*. Journal of the American Institute for Conservation, 2005. **44**(1): p. 13-26.
73. Robinson, A. L., Ebeler, S. E., Heymann, H., Boss, P. K., Solomon, P. S., Trengove, R. D., *Interactions between Wine Volatile Compounds and Grape and Wine Matrix Components Influence Aroma Compound Headspace Partitioning*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009. **57**(21): p. 10313-10322.
74. Górecki, T., Harynuk, J., Panic, O., *Comprehensive two-dimensional gas chromatography (GC x GC)*, in *New horizons and challenges in environmental analysis and monitoring*. 2003. p. 61-83.
75. Herrero, M., Ibanez, E., Cifuentes, A., Bernal, J., *Multidimensional chromatography in food analysis*. Journal of Chromatography A, 2009. **1216**(43): p. 7110-7129.
76. Perestrelo, R., Câmara, J. S., Rocha, S. M., *Impact of the Winemaking Process in Madeira Wine Composition: From Aging Markers to Ethyl Carbamate (A Contaminant)*, in *Nova Science Publishers*. 2011: New York.
77. Carey, F. A., *Organic Chemistry*. 4^a ed. 2000: Mcgraw-Hill College.
78. Atkins, P., Paula, J. d., *Biochemical Thermodynamics*, in *Physical Chemistry for the Life Sciences*. 2005, W. H. Freeman. p. 46-71.
79. The Good Scents, Company. 2001 [consultado 30-11-2011]; Disponível em: <http://www.thegoodscentscompany.com/>.
80. El-Sayed, AM. *The Pherobase: Database of Pheromones and Semiochemicals*. 2011 [consultado 30-11-2011]; Disponível em: <http://www.pherobase.com/>.
81. Gurbuz, O., Rouseff, J. M., Rouseff, R. L., *Comparison of aroma volatiles in commercial Merlot and Cabernet Sauvignon wines using gas chromatography - Olfactometry and gas chromatography - Mass spectrometry*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006. **54**(11): p. 3990-3996.
82. Campo, E., Ferreira, V., Escudero, A., Cacho, J., *Prediction of the wine sensory properties related to grape variety from dynamic-headspace gas chromatography-*

Bibliografia

- olfactometry data*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005. **53**(14): p. 5682-5690.
83. Schnermann, P., Schieberle, P., *Evaluation of key odorants in milk chocolate and cocoa cass by aroma extract dilution analyses*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1997. **45**: p. 867-872.
84. Jirovetz, L., Buchbauer, G., Ngassoum, M. B., Geissler, M., *Aroma compound analysis of Piper nigrum and Piper guineense essential oils from Cameroon using solid-phase microextraction -gas chromatography, solid-phase microextraction -gas chromatography -mass spectrometry and olfactometry*. Journal of Chromatography A, 2002. **976**: p. 265-275.
85. Zimmermann, M., Schieberle, P., *Important odorants of sweet bell pepper powder (Capsicum annuum cv. annuum): differences between samples of Hungarian and Moroccan origin*. European Food Research and Technology 2000. **211**: p. 175-180.
86. Adams, R. P., *Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry*. Allured Publishing Corporation. 1995, Carol Stream, IL.
87. Engel, E., Ratel, J., *Correction of the data generated by mass spectrometry analyses of biological tissues: Application to food authentication*. Journal of Chromatography A, 2007. **1154**: p. 331-341.
88. Berdague, J.-L., Denoyer, C., Le Quéré, J.-L., Semon, E., *Volatile components of dry-cured ham*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1991. **39**: p. 1257-1261.
89. Jordan, M. J., Margaria, C. A., Shaw, P. E., Goodner, K. L., *Aroma active components in aqueous Kiwi fruit essence and Kiwi fruit puree by GC-MS and multidimensional GC/GC-O*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002. **50**: p. 5386-5390.
90. Gioacchini, A. M., Santi, M. D., Guescini, M., Brandi, G., Stocchi, V., *Characterization of the volatile organic compounds of Italian 'Fossa' cheese by solid-phase microextraction gas chromatography/mass spectrometry*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2010. **24**(23): p. 3405-3412.
91. Pino, J. A., Mesa, J., Munoz, Y., Marti, M. P., Marbot, R., *Volatile components from mango (Mangifera indica L.) cultivars*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005. **53**(2213-2223).

Bibliografia

92. Machiels, D., Van Ruth, S. M., Posthumus, M. A., Istasse, L., *Gas chromatography-olfactometry analysis of the volatile compounds of two commercial Irish beef meats*. Talanta, 2003. **60**: p. 755-764.
93. Leffingwell, J. C., Alford, E.D. , *Volatile constituents of perique tobacco*. Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry, 2005. **4**: p. 899-915.
94. Robinson, A. L., Boss, P. K., Heymann, H., Solomon, P. S., Trengove, R. D., *Development of a sensitive non-targeted method for~characterizing the wine volatile profile using headspace solid-phase microextraction comprehensive two-dimensional gas chromatography time-of-flight mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 2011. **1218**: p. 504-517.
95. Cardeal, Z. I. S., P. P.; Silva, M. D. R. G.; Marriott, P. J., *Comprehensive two-dimensional gas chromatography for fingerprint pattern recognition in cachaça production*. Talanta, 2008. **74**: p. 793-799.
96. Babushok, V. I. Z., I. G. . *Chromatographia*, 2009, 257–269., *Retention indices for most frequently reported essential oil compounds in GC*. *Chromatographia*, 2009. **69**: p. 257-269.
97. Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., Dubourdieu, D., *Alcohols and Other Volatile Compounds*, in *Handbook of Enology - The Chemistry of Wine, Stabilization and Treatments*. 2006, John Wiley & Sons, Ltd. p. 51-64.
98. De Rosso, M., Cancian, D., Panighel, A., Dalla Vedova, A., Flamini, R., *Chemical compounds released from five different woods used to make barrels for aging wines and spirits: volatile compounds and polyphenols*. Wood Science and Technology, 2009. **43**(5-6): p. 375-385.